Rôle de l'interaction entre la protéine virale EBNA1 et le facteur cellulaire RCC1 dans la persistance du génome du virus d'Epstein-Barr

Thibaut Deschamps

▶ **To cite this version:**

Thibaut Deschamps. Rôle de l'interaction entre la protéine virale EBNA1 et le facteur cellulaire RCC1 dans la persistance du génome du virus d'Epstein-Barr. Virologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2015. Français. NNT : 2015ENSL1011 . tel-01257220

HAL Id: tel-01257220

https://theses.hal.science/tel-01257220

Submitted on 16 Jan 2016

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

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

THÈSE

en vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lyon, délivré par l'École Normale Supérieure de Lyon

Discipline : Sciences de la vie

Laboratoire Centre International de Recherche en Infectiologie

École Doctorale Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

présentée et soutenue publiquement le 18 septembre 2015

par Monsieur Thibaut DESCHAMPS

_____

Rôle de l'interaction entre la protéine virale EBNA1 et le facteur cellulaire RCC1 dans la persistance du génome du virus d'Epstein-Barr.

_____

Directeur de thèse : Mme Evelyne MANET

Après l'avis de :

M. Henri-Jacques DELECLUSE

M. Robin FAHRAEUS

Devant le jury composé de :

M. Henri-Jacques DELECLUSE	Rapporteur
M. Robin FAHRAEUS	Rapporteur
M. Patrick LOMONTE	Examinateur
M. Renaud MAHIEUX	Examinateur
Mme. Evelyne MANET	Directrice
M. Vincent MARECHAL	Examinateur

Remerciements

Afin toute chose, je souhaiterai remercier le Dr. Evelyne Manet de m'avoir permis d'effectuer cette thèse dans les meilleures conditions. Merci pour la confiance que tu as placé en moi et j'espère avoir été à la hauteur de tes attentes. Quelle était la probabilité pour qu'en me trompant de numéro de téléphone, il y a un peu plus de 4 ans, je tombe, non pas sur le Pr. Volchkov, mais sur toi, ayant un projet pour un thésard, travaillant sur EBV, connaissant Vincent et que cela nous mène jusqu'ici. Les proba' ce ne n'est pas mon fort mais j'imagine que cela ne doit pas être beaucoup !! Encore une fois, merci !

Je tiens à remercier les professeurs Henri-Jacques Delécluse et Robin Fåhraeus d'avoir accepté de juger mon travail de thèse au travers de ce manuscrit et d'assumer la responsabilité de rapporteur le jour de la défense.

Je souhaite également remercier le Dr. Patrick Lomonte et le Pr. Vincent Maréchal pour leurs conseils avisés au cours des comités de suivi thèse et d'avoir accepter de faire partie de mon jury. Merci également pour votre sympathie lors de nos différentes rencontres / discussions autour des herpesvirus. Merci à toi Vincent de m'avoir initié en master 2 au monde (merveilleux ?) d'EBV, et d'avoir continué à suivre mes aventures durant cette thèse.

Dernier membre du jury, et pas des moindres, je souhaite remercier le Pr. Renaud Mahieux pour son temps quant à l'éxamination de mon travail d'une part. D'autre part, je le remercie pour les 3 années d'enseignement effectuées à ces côtés notamment dans le cadre du TP Tax avec Chloé.

Je souhaite aussi remercier la Ligue contre le Cancer ainsi que tous ses donateurs qui, en finançant ma quatrième année de thèse, m'ont grandement aidé à réaliser mes travaux de thèse.

L'univers très positif du laboratoire a grandement contribué à l'aboutissement de cette thèse, c'est pourquoi je souhaiterai remercier l'ensemble des membres de l'équipe :

- merci à Henri pour sa sincérité, son sens de l'humour et ces remarques qui donnent le sourire les mauvais jours ! Je te remercie également pour ton implication dans le projet et pour toutes les interactions scientifiques ou non que nous avons partagé.

- merci à Fabrice, qui je dois dire à beaucoup de mérite ! Avoir supporté pendant tout ce temps la musique qui parfois devait être un peu forte et surtout très diverses. Merci pour les services que tu m'as rendu notamment pour les transferts que tu m'as arrété, cellules que tu m'as donné et bien d'autres ! S'il y avait un manuel de l'ingénieur de labo, il devrait prendre exemple sur ta rigueur et ton sérieux dans le travail ainsi que de ton amabilité ! Je te souhaite

de terminer ta thèse dans les meilleurs conditions (bon ok il n'y a plus grand chose à faire mais quand même) et de poursuivre ta carrière scientifique avec autant de brio qu'actuellement !

- merci à Valentin pour sa sympathie et sa bonne humeur qui ont contribué à l'ambiance positive de l'équipe. Je te souhaite également une bonne fin de thèse, encore 6 mois pour clore les manips qui restent, finir la rédaction et préparer l'oral, profites-en avant que cela ne soit fini et bon courage pour la suite !

- merci à Roberta, la nouvelle recrue venue d'un pays lointain (bah oui quand il y a des bouchons à Fréjus, l'Italie c'est super loin !). En quelques jours tu as su t'intégrer avec facilité et simplicité dans un laboratoire un peu trop masculin ! Je regrette vraiment de ne pas pouvoir travailler plus avec toi, j'aurai vraiment apprécier en apprendre plus ! En tout cas, saches que tu es entre de bonnes mains avec Evelyne et Henri et je sais également qu'ils ont fait un bon choix avec toi ! Bon courage dans ton combat pour la cristallisation du vPIC, je pense que tu vas en avoir besoin !

Les membres présents, c'est fait, passons à celles qui ont fait un bref passage par le laboratoire et qui ont notamment subit mon enseignement :

- merci à Maëva et Élodie (ma ptite Bestiole) d'avoir travaillé avec moi, je pense que vous m'avez appris autant de chose que j'ai essayé de vous en apprendre ! Les futurs étudiants que j'aurai sous ma responsabilité pourront vous remercier d'avoir été là pour m'apprendre ce que signifie encadrer un étudiant ! Je vous souhaite de réussir vos carrières respectives !

Il est également une personne qui m'a profondément marqué au début de ma thèse et qui a vraiment participé à la naissance du petit chercheur que je suis maintenant. En plus de son amitié, il m'a transmis son savoir et son expérience de la thèse. Je pense que sans lui cette thèse n'aurait pas été la même ! MERCI à toi Quentin ! Merci pour tous ces grands moments que nous avons vécu pendant tout ce temps et encore aujourd'hui. Le ptit verre dehors sur l'herbe, le réveil matinal en dansant, toutes les séances de sport, nos parties de Mario Kart interminable (et moi minable tout court) et bien d'autre encore ! Je tiens également à te féliciter d'être là où tu en est maintenant, tant professionnellement que personnellement et je souhaite vraiment que cela perdure encore longtemps ! Rendez-vous dans quelques années pour s'échanger nos étudiants !

Lors de ma première année de thèse j'ai également fait une très belle rencontre qui s'est noué en une franche amitié. A ma gauche, 1m85 (enfin je crois), et presque autant de barbe, un coup droit plein de panache (je vous le garanti), un courage hors norme (bah oui quoi reprendre ces études de la L1 après 30ans vous trouvez ça facile ?), un amour de la vie et de

ces plaisirs les plus simples ainsi qu'un cœur de gros nounours que tu as envi de prendre dans tes bras et de lui faire des papouilles, j'ai nommé le grand François BRIAT !!! Merci François de tout ce que tu m'as apporté pendant cette thèse, d'avoir été là également pendant les coups durs comme les bons moments ! Reste comme tu es en répandant la joie et la simplicité autour de toi, et promis, un jour je te laisserai peut-être gagné à El Grande, enfin peut-être.

Je souhaiterai poursuivre en remerciant 5 personnes en particuliers. Ces personnes que j'ai découvertes progressivement pour que au final cela se transforme en une situation de franche camaraderie et d'amitié (ou de coplèguittude vous dira l'une d'elle). Je pense qu'une bonne partie de l'intégrité de ma santé mentale vous revient ! C'était, c'est et ce sera toujours un grand plaisir de partager un café, une piste de ski, une bière, un jap', un rhum etc… avec vous autour de la science, des potins et des grandes questions de la vie que nous avons pu aborder ! Je suis fier et heureux d'avoir fait un bout de chemin avec vous et j'espère vraiment qu'il va continuer ! J'ai appris beaucoup de chose à vos côtés, et je vous remercie pour l'intérêt que vous portez à mon jugement scientifique, sincèrement cela me touche. Merci d'avoir été là pendant la crise de la 2ème année, puis aussi un peu celle de la 3ème et puis pour la dernière ligne droite, en gros pour tout le temps. Alors, à vous 5 à qui je souhaite tous ce que l'on peut vous souhaiter de mieux, je vous remercie du fond du cœur. Pour éviter les jaloux, je vais vous citer par ordre alphabétique inversé (vous la sentez la frustration de s'appeler Thibaut ?), MERCI À VOUS, le CIRI'PAMP VAINCRA :

VINCENT, SONIA, LUDOVIC, CHLOÉ, AXEL

Au cours de ces 4 ans de thèse, j'ai eu l'occasion de rencontrer une grande diversité de personnes qui a participé de près ou de loin au bon déroulement de mes années Lyonnaises. Alors à vous tous : OR, LR, AAV, TEV, EVIR, planteux, LBMCiens, CIRIiens divers et variés, BMICiens, étudiants, chefs d'équipe, ingénieurs, techniciens, secrétaires, à toutes les personnes qui participent à cette univers positif, je vous remercie ! Petit message pour Hélène grâce à qui ma carrière continue sans s'interrompre ! Bon courage pour ta thèse tite pharmacienne !

Mes remerciements s'adressent également aux personnes avec qui j'ai eu la chance de collaborer durant ce travail de thèse. Thank you to Joanna Wilson and Derek Leske in Glasgow for the peptide array and intersting remarks ! Merci à Lama pour son aide précieuse dans l'étude de retard sur gel et la reconstitution des nucléosomes. Un grand merci à l'ensemble de l'équipe du PLATIM pour leurs compétences, disponibilités et sympathies.

Merci à Christophe de m'avoir formé sur les différents appareils et à Claire, pour sa patience, que je viens voir 3 fois de suite pour des pépins différents sur le spinning.

Je terminerai avec celles et ceux qui me connaissent depuis longtemps, rencontré durant les années facs, voir avant. Merci aux membres des Jeudi Pasteurs, qui tout les ans honorent la mémoire de cette année difficile que fut le M2 ! Des remerciement particuliers vont à Anne-Laure, Chloé et Mom's pour toutes les sorties sur Paris et bien plus encore ! Merci à vous trois, rendez-vous sur les congrès internationaux et aux soutenance de nos futurs thésards !!

Et avec celles et ceux qui me connaissent depuis encore plus longtemps, l'ensemble des membres de ma famille ! Qui, certes n'ont pas toujours vraiment compris ce que je faisais ni pourquoi mais qui m'ont toujours soutenu inconditionnellement. J'espère vous avoir rendu fier de ce que je suis et de ce que je fais. Je terminerai en citant deux expressions :

There's no place like home ! *I'll be back !*

Enfin, je ne saurai comment remercier celle qui m'accompagne depuis maintenant 2 ans à travers ces épreuves et celles que je lui fait subir, bien malgré moi des fo… euh parfois désolé … Merci Vivi d'avoir fait de mon quotidien un jour différent à chaque fois, de m'avoir initié à l'escalade (qui maintenant est pire qu'une drogue), de partager mon amour pour les boissons houblonnées et les pièces de bœuf de plus de 1kg. Je ne vais pas faire une liste de tout ce qui me passe par la tête et que je te dois, cette liste ne sera jamais exhaustive, alors je me contenterai de l'humilité qui parfois me sied :

Merci.

Résumé

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpesvirus dont la séroprévalence est d'environ 90 % de la population adulte mondiale. EBV est associé à de nombreuses pathologies tumorales. La primo infection conduit à l'établissement du virus sous forme latente dans les lymphocytes B mémoires. Au sein de ces cellules B, le génome viral est sous la forme d'un épisome, un ADN circulaire double brin, et une fraction restreinte de gènes viraux est exprimée. Afin de se maintenir aux cours des divisions cellulaires, le génome viral est répliqué en phase S par la machinerie cellulaire et ségrégé lors de la mitose dans chaque cellules filles. La réplication et la ségrégation du génome viral nécessitent 2 facteurs viraux que sont la protéine virale EBNA1 (*Epstein-Barr Nuclear Antigen 1*) et la région *oriP* sur le génome viral. En phase S, EBNA1 interagit directement avec l'*oriP* et y recrute le complexe de pré-réplication de l'ADN. En mitose, EBNA1 ancre l'épisome à la chromatine ce qui permet une ségrégation efficace. Les mécanismes d'interaction entre EBNA1 et la chromatine reste encore flou. Au cours de notre travail, nous avons identifié la protéine RCC1 comme un partenaire potentiel pour la protéine EBNA1 pouvant être impliqué dans l'ancrage d'EBNA1 à la chromatine. Nous avons validé cette interaction et caractérisé les régions d'interactions pour ces deux protéines. Par ailleurs nous avons démontré que RCC1 est recrutée sur l'*oriP* en présence d'EBNA1 et que ces deux protéines interagissent en mitose. À la lumière de nos résultats et des données de la littérature, nous proposons que l'interaction d'EBNA1 avec la chromatine est dynamique et implique à la fois des interactions directes (AT-Hook, interaction avec les nucléosomes) mais aussi des facteurs cellulaires (RCC1, EBP2 et HMGB2).

Abréviations

A

aa : acide aminé

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARN : Acide RiboNucléique

B

BiFC : Bimolecular Fluorescence Complementation

BL : Lymphome de Burkitt

C

CBS : Chromatin Binding Sequence

CDK : Cyclin Dependant Kinase

ChIP : Chromatin Immunoprecipitation

CMV : CytoMegaloVirus

CTL : Lymphocyte T cytotoxique

D

DBD : DNA Binding Domain

dnEBNA1 : dominant negative EBNA1

DS : Dyad Symmetry

E

EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen

EBI : Epstein-Barr Induced protein

EBP2 : EBNA1 Binding Protein 2

EBV : Epstein-Barr Virus

F

FDC : Cellule Dendritique Folliculaire

FISH : Fluorescence *In-Situ* Hybridization

FR : Family of Repeat

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

G

GAP : GTPase Activating Protein

GC : Centre Germinatif

GDP : Guanosine DiPhosphate

GEF : Guanine Exchange Factor

GST : Glutathion-S-Transferase

GTP : Guanosine TriPhosphate

H

HL : Lymphome de Hodgkin

HMG(B) : High Mobility Group (Box)

HRS : Hodgkin/Reed-Sternberg

HSV : Herpes-Simplex Virus

I

ICTV : International Committee on Taxonomy for Viruses

IL : InterLeukine

IRES : Internal Ribosome Entry Site

K

kDa : kiloDalton

KSHV : Kaposi Sarcoma-associated HerpesVirus

L

LANA : Latency Associated Nuclear Antigen

LCL : Lignée Lymphoblastoïde

LMP : Latent Membrane Protein

LR : Linking Region

M

MCM : MiniChromosome Maintenance complex

miRBART : microRNA BamHI A Rightward Transcripts

MNI : MonoNucléose Infectieuse

N

NLS : Nuclear Localization Signal

NK : Natural Killer cell

NPC : Carcinome du NasoPharynx

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORC : Origin Recognition Complex

ORF : Open Reading Frame

P

pb : paire de bases

PML : ProMyelocitic Leukemia

pré-RC : Complexe de pré-Replication

PTLD : Post-Transplant Lymphoproliferative Disorder

Q

qPCR : quantitative Polymerase Chain Reaction

R

RanBP : Ran Binding Protein

RCC1 : Regulator of Chromosome Condensation 1

S

SAF : Spindle Assemby Factor

T

TR : Terminal Repeat

TRF : Telomeric Repeat Factor

U

UR : Région Unique

V

vPIC : viral Pre-Initiation Complex

VZV : Varicella-Zoster Virus

X

XLPD : X-Linked Lymphoproliferative Disorder

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE 19

I. GENERALITES SUR LES HERPESVIRUS 21
1. 3000 ANS D'HISTOIRE (VOIR B. ROIZMAN AND WHITLEY 2001 POUR REFERENCES) 21
2. LE REGNE DES *HERPESVIRALES* 21
3. CLASSIFICATION ET ORGANISATION GENOMIQUE DES *HERPESVIRIDAE* 22
4. DIVERSITE DES HERPESVIRUS HUMAINS 24
5. EPSTEIN-BARR VIRUS : UNE DECOUVERTE EMPREINTE DE SERENDIPITE 25
6. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES ET GENOMIQUES D'EBV 27

II. INFECTION PAR LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR 28
1. ÉTAPES PRECOCES DE L'INFECTION, DE L'ENTREE A L'ETABLISSEMENT SOUS FORME D'EPISOME 28
2. MODELE D'INFECTION *IN VIVO* 30
3. CYCLE PRODUCTIF DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR 36

III. PHYSIOPATHOLOGIE DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR 39
1. LA MONONUCLEOSE INFECTIEUSE (MNI ; BALFOUR, DUNMIRE, ET HOGQUIST 2015) 39
2. EBV ET CANCERS (VOIR CESARMAN 2014) 40
3. STRATEGIES THERAPEUTIQUES CONTRE LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR 46

IV. CONCLUSION 48

MECANISME DE PERSISTANCE DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR 51

I. MECANISMES DE PERSISTANCE DE VIRUS LATENTS 53
1. LATENCE DANS DES CELLULES QUIESCENTES STRICTES 53
2. LATENCE DANS DES CELLULES EN PROLIFERATION 54

II. MAINTIEN DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR 56
1. STRUCTURE DE L'*ORIP* 56
2. STRUCTURE DE LA PROTEINE EBNA1 58
3. ROLE D'EBNA1 DANS LA REPLICATION DU GENOME VIRAL PENDANT LA LATENCE 63
4. DYNAMIQUE ET EFFICACITE DE MAINTIEN DE L'EPISOME VIRAL AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE 65
5. SEGREGATION DU GENOME VIRAL LORS DE LA MITOSE 67
6. AUTRES FONCTIONS DE LA PROTEINE EBNA1 69
7. LANA, ORTHOLOGUE D'EBNA1 POUR KSHV (VOIR OHSAKI AND UEDA 2012 POUR REFERENCES) 70

III. EBNA1 ET CANCERS 71
1. ROLE D'EBNA1 DANS LES CANCERS ASSOCIES A EBV 71
2. STRATEGIES THERAPEUTIQUES REPOSANT SUR LA PROTEINE EBNA1 73

IV. CONCLUSION 76

REGULATOR OF CHROMOSOME CONDENSATION I – RCC1 79

I. STRUCTURE ET FONCTION DE LA PROTEINE RCC1 81
1. STRUCTURE DE RCC1 81
2. FONCTIONS DE RCC1 ET DYNAMIQUE D'INTERACTION AVEC LA CHROMATINE 83

RESULTATS 89

I. ARTICLE 91

II. ÉTUDE DE L'INTERACTION ENTRE EBNA1 ET RCC1 133
1. CONFIRMATION DE L'INTERACTION ENTRE EBNA1 ET RCC1 PAR BIFC 133
2. LA QUEUE N-TERMINALE DE RCC1 EST ESSENTIELLE A L'INTERACTION AVEC EBNA1 DANS LES CELLULES 134

3. L'INTERACTION AVEC EBNA1 N'EMPECHE PAS RCC1 D'INTERAGIR AVEC RAN 136
4. EBNA1 N'INTERAGIT PAS AVEC DES NUCLEOSOMES RECONSTITUES 138
III. ESSAIS DE MAINTIEN DE PLASMIDES DERIVES DU GENOME D'EBV POSSEDANT L'*ORIP* **139**
1. L'ABSENCE DE SELECTION CONDUIT A UNE PERTE RAPIDE DES PLASMIDES TRANSFECTES 140
2. LA PRESSION DE SELECTION N'INDUIT PAS UN MEILLEUR MAINTIEN DES EPISOMES VIRAUX 141
3. LE DOMAINE CORE N'A PAS D'EFFET SUR L'EFFICACITE DE MAINTIEN DU PLASMIDE PCEP4 143
IV. **144**
IV. MATERIELS ET METHODES SUPPLEMENTAIRES **145**
1. RECONSTITUTION DE NUCLEOSOMES ET RETARD SUR GEL 145
2. BIMOLECULAR FLUORESCENCE COMPLEMENTATION (BIFC) 145
3. ANALYSE DU MAINTIEN DES PLASMIDES PCEP4 145
4. LISTE DES AMORCES ET ANTICORPS UTILISES 146

DISCUSSION **149**

I. MECANISME DE RECRUTEMENT DE LA PROTEINE EBNA1 SUR LA CHROMATINE MITOTIQUE **151**
II. EFFICACITE DE MAINTIEN DE L'EPISOME VIRAL **156**
III. EBNA1-RCC1 DANS LE PROCESSUS APOPTOTIQUE **158**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **161**

ANNEXE BIBLIOGRAPHIQUE **191**

I. EPSTEIN-BARR VIRUS NUCLEAR ANTIGEN 3A MODULATES CELLULAR GENE TRANSCRIPTION THROUGH INTERACTION WITH MIZ-1 **193**
II. EPSTEIN-BARR VIRUS LATE GENE TRANSCRIPTION DEPENDS ON THE ASSEMBLY OF A VIRUS-SPECIFIC PREINITIATION COMPLEX **195**

Introduction générale

I. Généralités sur les herpesvirus

1. 3000 ans d'histoire (voir B. Roizman and Whitley 2001 pour références)

Les premières traces écrites concernant le terme herpes sont attribuées à la Grèce antique et plus précisément à Hippocrate qui décrit 400 ans avant Jésus-Christ des lésions « rampantes » sur la peau qu'il nomme 'herpes'. 1000 ans auparavant les Sumériens décrivaient déjà sur des tablettes des lésions semblables à une infection par le Virus Herpes Simplex de type 1 (HSV1), lésions pouvant cependant être attribuées à un autre agent infectieux voire même une pathologie cutanée. La première description de lésion cutanée liée à un herpesvirus revient probablement à Aulus Cornelius Celsus qui décrit au I^{er} siècle des lésions rondes qui au cours du temps diffusent et s'étendent de manière longitudinale. Ce type de lésion pourrait être attribué au Virus de la Varicelle et du Zona (VZV). Sur la base des découvertes d'Hérodotes qui fit le lien entre éruption cutanée et fièvre, Galen est le premier à observer une récurrence de lésion au même site anatomique, signature caractéristique d'une infection par HSV1.

HSV1 a été pendant de nombreuses décennies l'herpesvirus le plus étudié ce qui conduit en 1939 à l'émergence d'une caractéristique fondamentale de cette famille virale. En effet en 1939 Burnett et Williams déclarent (Burnet et Williams 1939) :

« *Herpes simplex infections, however, once contracted, seem to persist for life. The virus remains for the most part latent; but under the stimulus of trauma, fever, and so forth it may at any time called into activity and provoke a visible herpetic lesion.*»

Le phénomène de latence décrit ici représente l'une des caractéristiques majeures des herpesvirus. C'est ensuite grâce à l'exploitation de la culture cellulaire à partir des années 1950 que de nombreux herpesvirus ont été identifiés comme le CytoMégaloVirus (CMV), le VZV et plus tardivement le Virus d'Epstein-Barr (EBV).

2. Le règne des *Herpesvirales*

Evidemment les herpesvirus ne sont pas les seuls à avoir été découverts grâce aux avancées techniques liées à la culture cellulaire. Ainsi, afin de mettre en ordre et de classifier le monde viral, l'ICTV (*International Committee on Taxonomy for Viruses*) publie en 1971 le premier volume de taxonomie virale qui regroupe 293 espèces virales réparties dans 2 familles pour 43 genres. A cette époque, le genre *Herpesvirus* regroupait 21 espèces avec une gamme d'hôtes hautement diversifiée allant du mammifère (primate ou non) jusqu'au reptile avec l'espèce *Snake Herpesvirus*. Lors de ce premier rapport, les méthodes de classification

s'appuyaient sur des caractéristiques d'ordre morphologique obtenues à l'aide de la microscopie électronique à balayage, brevetée en 1931 par Reinhold Rudenberg. Les virions des herpesvirus ont une forme sphérique d'un diamètre approximatif de 200 nm. La particule virale se compose de 4 éléments majeurs : le core, le tégument, l'enveloppe et la capside d'un diamètre de 130 nm (**figure 1**).

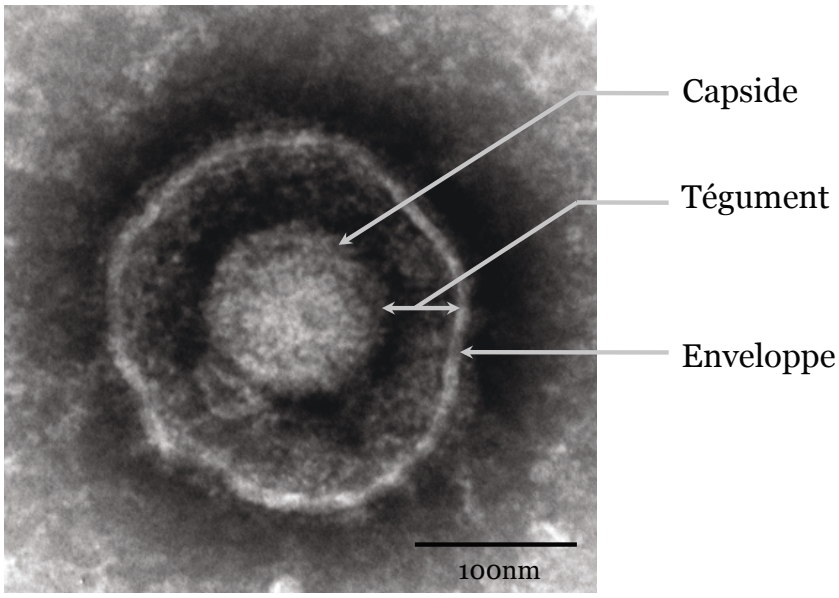


Figure 1 : Structure du virion des *Herpesvirinae*

Photographie en microscopie électronique à transmission d'une particule d'herpesvirus. Crédit photo au service microscopie de l'hôpitale de la Timone (directeur : Hervé Raoult).

Toujours fondées sur ces critères, 42 ans après le premier rapport par l'ICTV (dernière publication officielle – Juillet 2014), 26 familles virales sont regroupées dans 7 ordres différents (78 familles n'appartiennent pas encore à un ordre) parmi lesquels figure celui des *Herpesvirales*. Cet ordre se compose de 3 familles distinctes notamment par leurs spectres d'hôtes respectifs : les *Alloherpesviridae* et *Malacoherpesviridae* ont un spectre restreint aux vertébrés et invertébrés marins (poisson, amphibien, mollusque). La famille des *Herpesviridae* regroupe quant à elle l'ensemble des virus infectant les vertébrés terrestres allant de l'iguane à l'éléphant, les oiseaux et les primates humain et non-humain. Les *Herpesviridae* comptent aujourd'hui 88 espèces répertoriées, réparties en 3 sous-familles établies initialement en 1978 : *Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae et Gammaherpesvirinae*. La classification des *Herpesviridae*, toujours en vigueur, est établie en fonction de leurs propriétés biologiques, tropismes, homologies et organisations génomiques.

3. Classification et organisation génomique des *Herpesviridae*

La découverte de l'ADN polymérase ADN dépendante en 1956 par Arthur Kronberg (Mullis et Faloona 1987) mais surtout le développement de la méthode de Sanger (Sanger,

Nicklen, et Coulson 1977) ont permis d'initier les premiers travaux de séquençage et ainsi d'une nouvelle ère dans la classification des virus. D'un point de vue de l'organisation des génomes, des similitudes entre chaque genre sont observables, fondées sur la position de diverses régions répétées. Ainsi en 2001 Roizman et Pellett classent les *Herpesviridae* en fonction de 6 organisations génomiques différentes observées (Bernard Roizman, s. d.). L'apparition de ces séquences répétées est vraisemblablement due à un événement particulier lors de la réplication du génome viral plutôt qu'une histoire évolutive commune entre les espèces partageant la même organisation, ce qui rend caduque leurs utilisations pour la classification des *Herpesviridae* d'un point de vue phylogénétique.

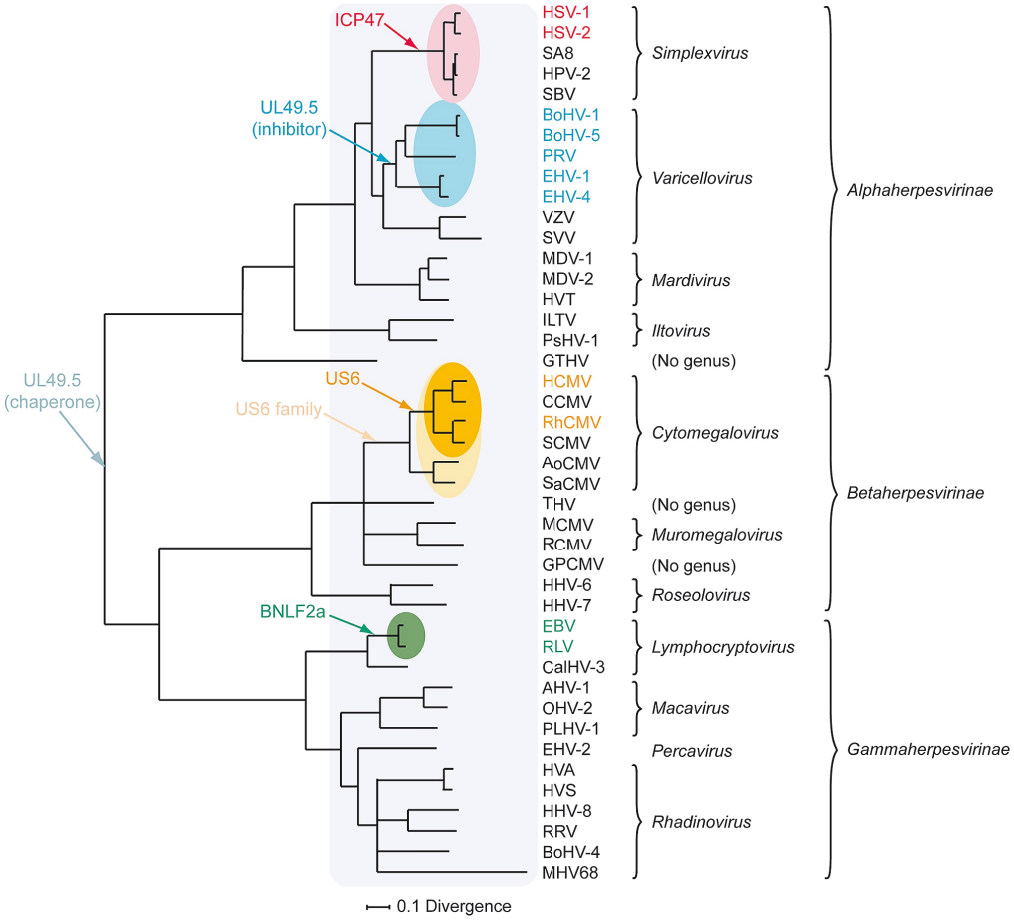


Figure 2 : Arbre phylogénétique des *Herpesviridae* (d'après Verweij *et al.*)

Arbre phylogénétique, exploitant le théorème de Baye, construit par l'alignement de la séquence en acide aminé de 6 gènes conservés (pour EBV : BDRF1, BcLF1, BALF4, BALF3, BALF2 et BALF5). L'apparition de gènes spécifiques est représenté en couleur.

Les progrès du séquençage ont permis d'enrichir grandement les connaissances sur la génétique aussi bien humaine, animale que virale. On comptabilise actuellement 68 génomes d'herpesvirus entièrement séquencés (disponibles à cette adresse : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses). Ces données n'ont permis d'identifier que 3 gènes homologues pour l'ensemble des *Herpesvirales* (ADN polymérase, UTPase et une

ATPase) traduisant une forte divergence génétique entre les 3 familles malgré une morphologie proche. A l'inverse il existe une forte relation entre les *Herpesviradae,* desquels il est possible de dégager 43 gènes partagés suggérant que ces virus sont vraisemblablement issus d'un ancêtre commun (McGeoch et Davison 1999) remontant à environ 400 millions d'années (McGeoch et Gatherer 2005 ; Verweij *et al.* 2015 ; **figure 2**). L'organisation de ces gènes est sensiblement la même au sein d'une sous-famille à l'exception des *Alphaherpesvirinae,* des réarrangements sont observables pour les genres *Varicellovirus* et *Iltovirus* par rapport aux autres genres. L'organisation de ces gènes au sein d'une sous-famille se fait sous forme de blocs dont la disposition varie d'une sous-famille à l'autre. Ces blocs regroupent principalement des gènes essentiels au cycle viral : réplication, formation de la capside, intégration du génome viral dans la capside (voir Dunn *et al.* 2003 pour l'exemple du CMV). De part une longue co-évolution avec son hôte, voire même une co-spéciation, les herpesvirus sont hautement adaptés à leurs hôtes et représentent les virus pour lesquels la prévalence mondiale est la plus élevée (Ensser, Pflanz, et Fleckenstein 1997).

4. Diversité des herpesvirus humains

Les *Herpesviridae* représentent une famille virale ayant un large spectre d'hôtes allant des vertébrés terrestres aux oiseaux. Actuellement, il a été dénombré 8 virus infectant l'homme : les Herpes Simplex de type 1 et 2 (HSV1 – HSV2), le Cytomegalovirus (CMV), le virus de la Varicelle et du Zona (VZV), le virus d'Epstein-Barr (EBV), les virus HHV6 et 7 et le virus du sarcome de Kaposi (KSHV). Chacun de ces virus est associé à des pathologies différentes listées dans le **tableau 1**.

Virus	Sous-famille	Tropisme	Pathologies associées
HSV1 **HSV2**	*α-herpesvirinae*	Ganglions nerveux sensitif Epithélium	Herpes labial, génital ou néonatal Encéphalites, Kératites
VZV	*α-herpesvirinae*		Varicelle, Zona
CMV	*β-herpesvirinae*	Épithélium, endothélium, monocytes et cellules musculaires	Syndrome mononucléosique, hépatite, rétinite, pneumonie
HHV6	*β-herpesvirinae*	Lymphocyte B et T, Natural Killer (NK), monocyte, épithélium et cellules nerveuses	Roséole
HHV7	*β-herpesvirinae*	Lymphocyte T $CD4^+$, épithélium des glandes salivaires	Syndrome proche de la Roséole
EBV	*γ-herpesvirinae*	Épithéliums Lymphocyte B	Syndrome mononucléosique, Lymphomes, Carcinomes
KSHV	*γ-herpesvirinae*	Lymphocyte B	Lymphomes, Sarcome de Kaposi

Tableau 1 : Liste des 8 *Herpesviridae* infectant l'Homme

La nomenclature officielle des herpesvirus se construit avec la première lettre représentant le nom de l'hôte (H : Human, E : Equine, M : Murine …), les deux suivantes pour HerpesVirus et un chiffre représentant l'ordre de découverte. Une seconde nomenclature a été appliquée à certains virus en fonction de leurs propriétés ou des personnes l'ayant caractérisés. HSV1 : HHV1, HSV2 : HHV2, VZV : HHV3, EBV : HHV4, CMV : HHV5, KSHV : HHV8.

5. Epstein-Barr Virus : une découverte empreinte de sérendipité

Dans les années 1960, la découverte d'agents infectieux provoquant des cancers dans des modèles animaux divers a ouvert la question de l'existence d'un tel phénomène chez l'Homme. C'est dans ce contexte qu'Anthony Epstein décide de partir à la recherche d'un tel pathogène chez l'homme en utilisant la microscopie électronique comme approche : si un virus est impliqué dans le développement d'une tumeur, il y a une chance d'observer des particules virales au sein de cellules tumorales. En 1961, Denis Burkitt, un chirurgien opérant

en Ouganda, fit une présentation sur une tumeur touchant principalement des enfants dans des zones présentant de hautes températures et de forte chutes de pluies, tumeur qui fut par la suite nommée Lymphome de Burkitt. Le lien entre les conditions climatiques et l'incidence de la pathologie pouvait laisser penser à une association avec une maladie infectieuse. Cette possibilité n'échappa pas à A. Epstein qui décida d'assister à la conférence. S'ensuivit une collaboration avec D. Burkitt afin de chercher une origine virale à ces tumeurs. Durant les 3 années qui suivirent, A. Epstein essaya d'observer des particules virales au sein de biopsies envoyées par D. Burkitt, en vain. En décembre 1963 des suites d'un retard d'acheminement du matériel biologique envoyé par D. Burkitt, des cellules s'étaient détachées de la tumeur et après mise en culture se mirent à proliférer spontanément : la première lignée de lymphome de Burkitt, EB1, venait d'être établie (**figure 3-A**). L'analyse par microscopie électronique, en février 1964, révéla la présence de particules virales similaires à celle des herpesvirus dans environ 1 % de la population cellulaire (Epstein, Achong, et Barr 1964) (**figure 3-B**). Cette découverte fut le point de départ d'une longue histoire sur l'association entre virus et cancer humain qui va bien au delà du lymphome de Burkitt (voir *The story of Epstein-Barr virus, CANCER VIRUS* pour un récit complet de l'histoire).

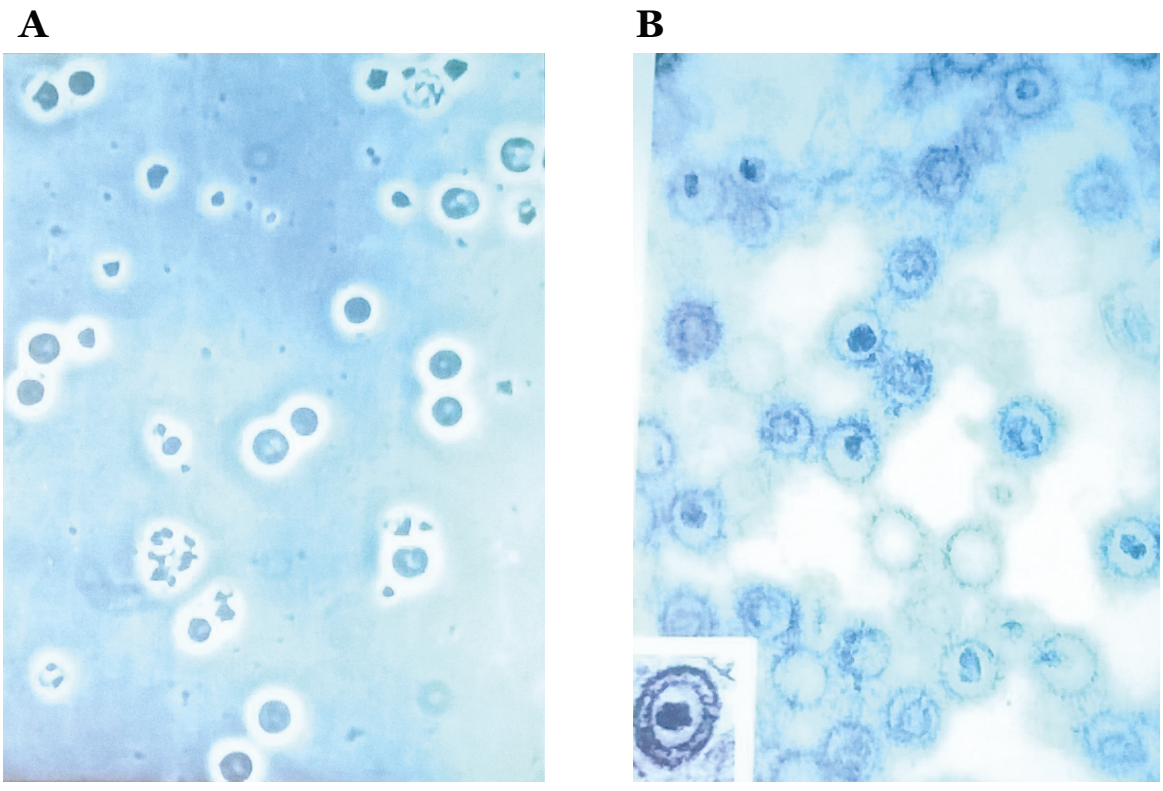


Figure 3 : Premières preuves de la découverte du virus Epstein-Barr

(A) Photographie en microscopie optique de lymphoblastes précurseurs de la ligné cellulaire EB1 (prise le 5 décembre 1963) et (B) photographie en microscopie électronique à transmission de virions d'EBV prise en 1964 par Anthony Epstein (grossissement en encart). Clichés présentés à l'occasion du congrès célébrant les 50 ans de la découverte de EBV.

6. Caractéristiques structurales et génomiques d'EBV

EBV est un virus enveloppé à capside icosaédrique composée de 162 capsomères. Le génome à ADN double brin d'environ 180 kB est linéaire dans la particule et sous forme d'épisome dans le noyau cellulaire. L'enveloppe du virion se compose des glycoprotéines gB, gH, gL, gM et gN, communes à l'ensemble des *Herpesviridae*, et des glycoprotéines gp350/220, communes avec KSHV. Les glycoprotéines gp350/220 sont les plus représentées à la surface du virion et sont notamment responsables du tropisme viral. L'espace entre l'enveloppe et la capside est occupé par le tégument. Ce tégument se compose d'une grande variété de protéines virales et cellulaires impliquées notamment dans les étapes de maturation de la particule virale ou encore lors des étapes précoces de l'infection (Johannsen *et al.* 2004).

Le premier séquençage complet du génome du virus d'Epstein-Barr, plus particulièrement de la souche B95.8, a été publié en 1984 (Baer *et al.* 1984 ; accession number V01555). Cette souche, qui fait office de référence depuis de nombreuses années, comporterait entre 85 et 95 ORF (*Open Reading Frame* – Cadre Ouvert de Lecture), mais présente une large délétion de 13.6 kpb (comportant 3 ORF) par rapport aux autres génomes viraux connus (notamment celui issu de la lignée de lymphome de Burkitt « Raji »). En plus des ces ORF, le génome viral code pour divers ARN non codants que sont les EBER1 et 2 (Iwakiri et Takada 2010) et une série de miARN (les miRBART (Qiu *et al.* 2015) et miRBHRF1) impliqués notamment dans la résistance à l'apoptose et le maintien de l'état prolifératif de la cellule infectée. A chacune des extrémités du génome viral se trouvent 4 à 12 séquences répétées (Terminal Repeat - TR) en tandem de 530 pb. Ces séquences sont impliquées dans la circularisation du génome dans le noyau : la forme épisomale est la forme de maintien dominante du virus, l'intégration restant un événement rare. Cependant, certaines études épidémiologiques montrent la présence de génomes viraux intégrés dans plus de 30 % de lymphomes EBV^+ ou encore 12 % de NPC (Ohshima *et al.* 1998).

En 1986, une étude évoque pour la première fois la présence d'un second type viral (type B ou 2) différent de la lignée B95.8 (type A ou 1) fondé sur la séquence du gène EBNA2, moins fréquent et ayant une distribution géographique localisée en centre Afrique (Zimber *et al.* 1986). Ce n'est qu'en 2006 que sera publiée une séquence complète du virus d'Epstein-Barr type 2 (Dolan *et al.* 2006) (souche AG876). Ce séquençage a permis de confirmer les différences observées dès 1986 concernant la séquence du gène codant pour la protéine EBNA2. L'homologie de séquence entre les différents gènes de chaque sous-type est supérieure à 95 % excepté pour le gène codant EBNA2 pour lequel on observe 70 % d'identité au niveau nucléotidique et seulement 54 % d'identité au niveau protéique. Par ailleurs, comme décrit en 1986, EBV type 1 est le sous-type prévalent dans le monde, hormis dans la

région sub-saharienne dans laquelle type 1 et type 2 sont présents de manière équivalente. D'un point de vue phénotypique, EBV type 2 est beaucoup moins efficace dans la transformation et l'immortalisation de lymphocytes B primaires en LCL que le type 1. Une substitution du gène EBNA2 type 2 dans un fond génétique type 1 corrèle avec un phénotype type 2 et *vice-versa*, confirmant bien l'utilisation du gène EBNA2 dans la discrimination entre ces deux types. De nombreux variants alléliques de gènes viraux, au sein de tumeurs notamment, ont été reportés (voir Tzellos and Farrell 2012 pour une revue).

II. Infection par le virus d'Epstein-Barr

L'une des caractéristiques communes à l'ensemble des herpesvirus est leur capacité à se maintenir de manière latente au sein de l'hôte, tout au long de sa vie (Kaschka-Dierich *et al.* 1977). Des évènements de réactivation entrainent une production de virions et assurent ainsi la transmission du virus. La voie majeure de transmission du virus se fait par la salive, mais des cas de transmissions par voie sexuelle, transfusion sanguine ou encore transplantation ont été répertoriés. À l'heure actuelle, il est estimé que plus de 90 % de la population adulte mondiale est infectée de manière latente par EBV. La primo-infection a lieu principalement lors des premières années de la vie par transmission salivaire, notamment des suites d'un baiser ou de partage d'objets souillés (verre, tétine…). Il existe cependant une dynamique d'infection différente en fonction des milieux sociaux économiques : les milieux les plus aisés ont un délai de séroconversion retardé comparé aux milieux plus modestes (Henle *et al.* 1969).

1. Étapes précoces de l'infection, de l'entrée à l'établissement sous forme d'épisome

L'infection d'une cellule naïve par EBV peut se décomposer en trois étapes : interaction avec le récepteur / internalisation du virion, transport de la capside jusqu'à l'enveloppe nucléaire et enfin transfert du génome viral et sa circularisation dans le noyau. Il est à noter que ces étapes précoces de l'infection restent peu documentées.

Les mécanismes d'entrée diffèrent entre le lymphocyte B et la cellule épithéliale. Dans le cas du lymphocyte B, l'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire se fait par l'interaction entre les glycoprotéines gp350/220 présentes à la surface de l'enveloppe virale avec le récepteur cellulaire CD21 présent sur les lymphocytes B (**figure 4**). L'interaction avec le CD21 induit une endocytose clathrine-indépendante de la particule virale (Tanner *et al.* 1987). En 2013, Ogembo *et al.* (Ogembo *et al.* 2013) identifient la protéine CD35 comme nouveau récepteur pour l'attachement d'EBV. Cette protéine est exprimée à la surface de nombreux types cellulaires : cellules B et T, cellules dendritiques folliculaires, neutrophiles, monocytes, *etc.* Cette découverte permet notamment d'expliquer l'infection de cellules hématopoïétique $CD21^-$ ou encore l'infection de lymphocytes B d'un patient $CD21^{-/-}$. La fusion

de l'enveloppe avec la membrane de la vésicule nécessite 4 glycoprotéines virales qui sont gp42, gB, gH et gL (Haddad et Hutt-Fletcher 1989). Le modèle de fusion actuel est le suivant : la protéine gp42, en interagissant avec le CMH-II, déclencherait le mécanisme de fusion *via* les protéines gB, gH et gL, libérant ainsi la capside dans le cytoplasme cellulaire.

Les cellules épithéliales n'expriment pas ou très peu le récepteur CD21 et n'expriment pas le CMH-II, rendant l'infection indépendante de la protéine gp42. A l'inverse de l'infection des cellules B, le mécanisme d'attachement du virion à la surface de la cellule épithéliale n'entraine pas d'endocytose et reste à l'heure actuelle mal connu. Deux hypothèses se dégagent néanmoins : la première implique le récepteur aux IgA qui interagirait avec des particules virales recouvertes d'IgA spécifiques des glycoprotéines gp350/220 (Sixbey et Yao 1992) ; la seconde serait la présence à la surface de la cellule épithéliale d'un récepteur facilitant l'ancrage en interagissant avec les protéines gH et gL. De la même façon, le mécanisme de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane cellulaire n'est pas connu. L'hypothèse la plus probable est la présence d'un co-récepteur qui induirait la fusion après interaction avec les protéines gH et gL. Les travaux de Xiao *et al.* (Xiao *et al.* 2007) ont permis l'identification d'une interaction entre la glycoprotéine BMRF-2 et les intégrines β1, α5, α3 et αv. Ces interactions pourraient avoir un rôle à la fois dans l'attachement, la fusion mais également dans la propagation du virus de cellule à cellule. Il a été décrit le cas de patients agammaglobulinémiques $CD21^{-/-}$ et $CD35^{-/-}$ exempts de toute trace d'EBV (Faulkner *et al.* 1999), traduisant la nécessité de ces deux récepteurs dans l'infection par EBV des cellules B, mais également d'un intermédiaire lymphocytaire pour l'infection des cellules épithéliales.

A la suite de la fusion, la capside est libérée dans le cytoplasme et migre jusqu'au noyau où le génome viral est transféré au travers du pore nucléaire. Les étapes de migration de la capside ne sont pas encore décrites, aussi bien pour l'infection des cellules B que des cellules épithéliales. Les étapes de circularisation et de dépôt de marqueurs chromatiniens sur le génome dans le noyau restent encore mal connues (**figure 4**).

Le mécanisme conduisant à la circularisation fait vraisemblablement appel à un système de recombinaison homologue ainsi qu'à une étape de ligation au niveau des régions TR. Le dépôt de marqueurs chromatiniens sur le génome viral est une étape cruciale dans l'établissement de la latence et surtout l'inhibition des gènes du cycle productif. Cette organisation sous forme de chromatine est notamment importante pour la régulation des différents gènes viraux impliqués dans la mise en place de la latence. La protéine du tégument BNRF1 a été décrite comme capable de bloquer le dépôt de marqueur inhibiteur sur le génome en bloquant l'interaction DAXX / ATRX (Lieberman 2013; Tsai *et al.* 2014). Cependant les mécanismes responsables de la chromatinisation du génome ne sont pas encore caractérisés.

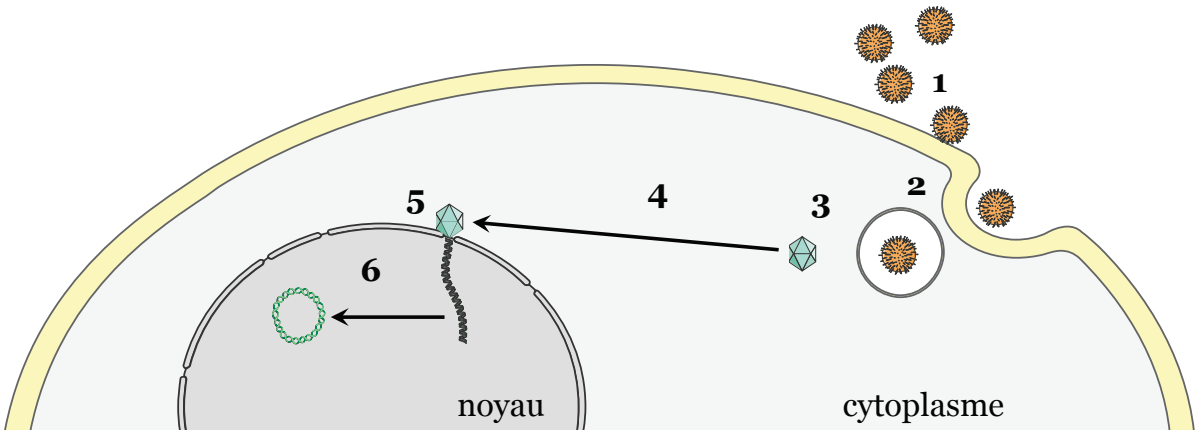


Figure 4 : Schéma des étapes précoces de l'infection par EBV

1.Attachement de la particule virale à la membrane cellulaire.
2.Endocytose indépendante de la clathrine du virion.
3.Fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome libérant la capside dans le cytoplasme.
4.Migration de la capside jusqu'au noyau
5.Libération de l'ADN viral dans le noyau au travers du pore nucléaire
6.Circularisation et mise en place de la chromatine sur le génome viral

2. Modèle d'infection *in vivo*

La transition du lymphocyte B naïf nouvellement infecté au lymphocyte B mémoire circulant, siège du maintien du virus en latence, implique de nombreux processus de maturation du lymphocyte, s'accompagnant d'une évolution du spectre d'expression des protéines virales. Les bases du modèle actuel ont été proposées en 2001 par Thorley-Lawson (Thorley-Lawson 2001) : ce modèle, nommé modèle du centre germinatif (Germinal Center Model – GCM), établit un parallèle entre les étapes d'activation, de différenciation, de prolifération et d'établissement de l'état mémoire du lymphocyte B par stimulation d'un antigène, et l'infection par EBV.

*a. De la salive au centre germinatif (**figure 5**)*

Lors de la primo-infection, le virion pénètre l'organisme au niveau des amygdales formant l'anneau lymphatique de Waldeyer. La particule virale transite au travers de l'épithélium oropharyngé pour infecter les lymphocytes B naïfs sous-jacents à cet épithélium. Le mécanisme de transit de la zone apicale à la zone basale n'est à l'heure actuelle pas encore élucidé. Deux hypothèses sont énoncées :

- primo-infection des cellules épithéliales créant un foyer de production massif de virus infectant ensuite les lymphocytes B sous-jacents

- phénomène de transcytose au travers des cryptes de l'amygdale se traduisant par une infection des lymphocytes B sous-jacents sans intermédiaire épithélial (Tugizov, Herrera, et Palefsky 2013).

Divers arguments sont en faveur de cette seconde hypothèse : le premier est d'ordre spatial, les lymphocytes B naïfs infectés par EBV se situant directement en dessous de

l'épithélium des amygdales ; ensuite, l'enveloppe des particules virales présente dans la salive est enrichie en glycoprotéine gp42 indispensable à l'infection des lymphocytes et inhibant l'infection de cellules épithéliales (Jiang, Scott, et Hutt-Fletcher 2006). Enfin les travaux de Shannon-Lowe *et al.* démontrent que l'infection de cellules épithéliales est plus efficace lorsque les virions sont présentés par un lymphocyte B (Shannon-Lowe *et al.* 2009). Une autre étude, publiée par la même équipe, démontrent que les cellules B mémoires $CD11b^+$ sont responsables de l'infection des cellules épithéliales et que cette infection est plus efficace du côté basolatéral (Shannon-Lowe et Rowe 2011).

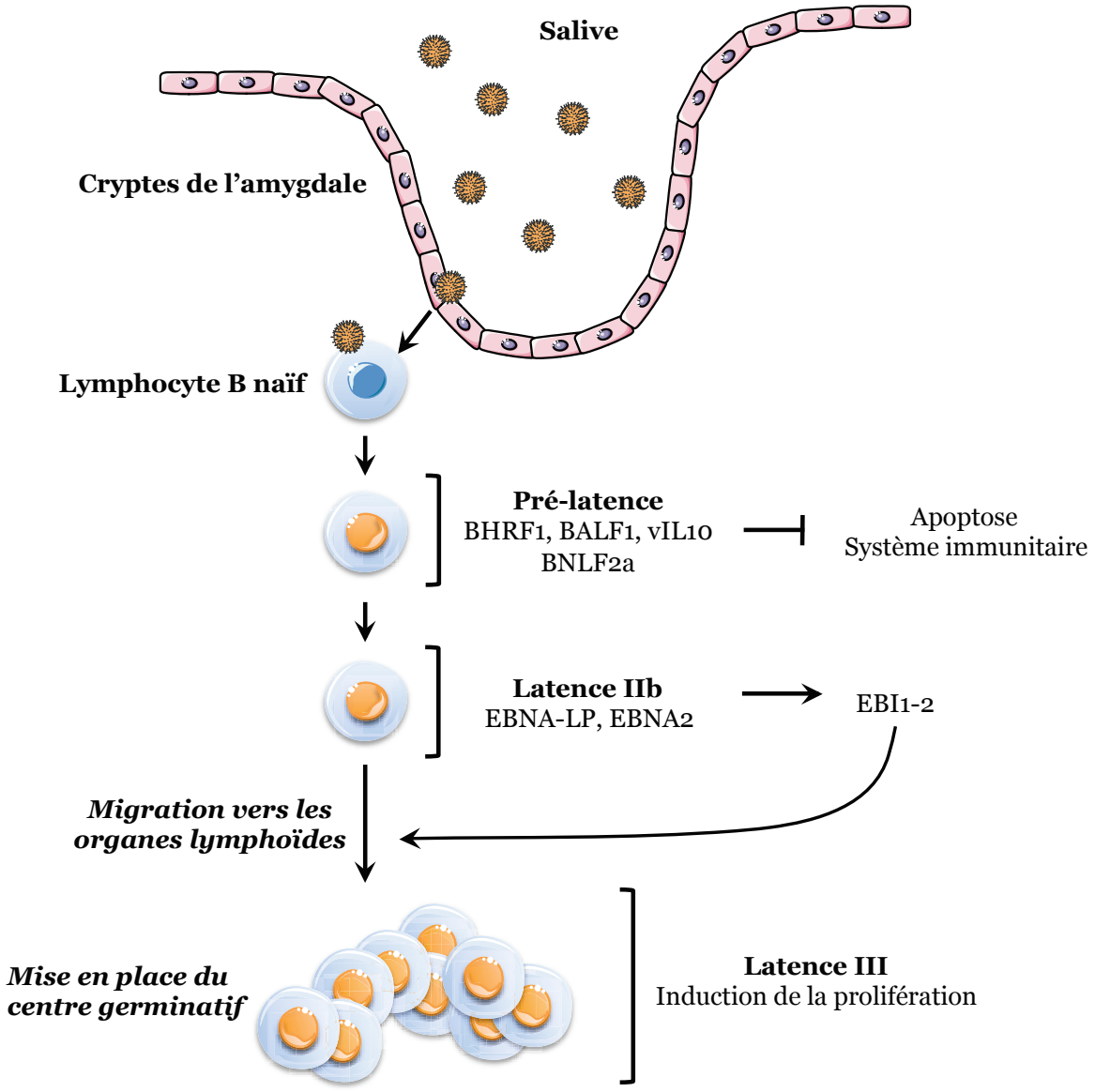


Figure 5 : Modèle d'infection in vivo, de la salive au centre germinatif

Le virus présent dans la salive traverse l'épithélium des cryptes des amygdales et infecte les lymphocytes B naïfs sous-jacents. L'expression des protéines du cycle productif est progressivement inhibée et la latence IIb est mise en place. Les protéines virales EBNA-LP et EBNA2 induisent l'expression des protéines EBI1-2 permettant la migration de la cellule B infectée dans les organes lymphoïdes. L'accumulation de ces 2 facteurs active la prolifération cellulaire et la mise en place de la latence III par l'activation du promoteur Cp, ce qui conduit à la mise en place d'un centre germinatif.

Cette infection mime la rencontre entre le lymphocyte B et un antigène, induisant la différenciation et la prolifération du B en lymphoblaste, à la différence que la cellule B infectée par EBV ne nécessite pas de co-stimulation par des lymphocytes T_H, des cellules présentatrices d'antigènes ou encore des cytokines. La période entre l'infection et la première division cellulaire constitue la phase de pré-latence durant laquelle est exprimée une grande variété de protéines virales avec aussi bien des protéines de la phase productive que de la phase latente. Durant cette phase de pré-latence BHRF1 et BALF1, deux homologues viraux du gène cellulaire anti-apoptotique BCL2, sont exprimés (vBcl-2s). En absence des ces 2 facteurs, les lymphocytes B infectés n'entrent pas en cycle prolifératif et meurent prématurément par apoptose (Altmann et Hammerschmidt 2005). Afin de limiter l'activation du système immunitaire résultant de l'infection, deux protéines virales impliquées dans l'évasion immunitaire sont exprimées lors de cette phase de pré-latence : la protéine vIL10 (codée par le gène BCRF1), un analogue de l'IL-10, est une protéine anti-inflammatoire qui limite notamment la libération de cytokines pro-inflammatoires ou encore atténue l'activité des Cellules Tueuses Naturelles (Natural Killer Cell – NK) (Jochum *et al.* 2012) ; BNLF2a réduit quant à elle la reconnaissance du B infecté par les cellules T_{CD8^+}.

Les premières protéines virales de la phase latente exprimées sont EBNA-LP et EBNA2 sous contrôle du promoteur W (Wp : Woisetschlaeger, Strominger, et Speck 1989). Ce profil d'expression viral, dit de latence IIb, induit la migration du lymphocyte B infecté vers les follicules. Cette migration, lors d'une activation par un antigène, est dépendante notamment de l'expression des protéines cellulaires EBI1-2 (Epstein-Barr Induced molecules 1 et 2) et du récepteur CCR7 (Gatto, Wood, et Brink 2011). Dans le cas d'une infection par EBV, l'expression de ces deux protéines est induite par EBNA-LP et/ou EBNA2 (Birkenbach *et al.* 1993). À ce stade, les lymphocytes B infectés par EBV sont situés à la bordure B/T du follicule. L'ensemble de ces évènements se situe avant la première division du lymphocyte B infecté. C'est l'accumulation des protéines EBNA-LP et EBNA2 qui permet l'activation du promoteur C (Cp) et ainsi la production des protéines EBNA1, EBNA3A, 3B et 3C produites à partir de transcrits différemment épissés (Alfieri, Birkenbach, et Kieff 1991 ; voir **figure 6** pour les différents profils de latences présents au cours de l'infection). L'expression de ces protéines permet au lymphocyte B d'entrer dans un état prolifératif. Cette capacité serait principalement portée par les EBNAs (Sinclair 2003; Kalla *et al.* 2010). La protéine EBNA1 permet la réplication du génome viral au cours des divisions successives.

L'induction de la première division cellulaire s'accompagne d'une extinction de l'expression des gènes du cycle productif et seules les protéines de latence persistent : il s'agit ici du programme de latence III ou programme de croissance. Il se caractérise notamment par l'activation du promoteur LMP induit par les protéines EBNA2 et EBNA3C (Jiménez-Ramírez *et al.* 2006). La protéine LMP1 est impliquée dans l'expression de facteurs

d'activations du lymphocyte B (CD23, CD40, CD44) ainsi que dans l'inhibition de l'apoptose par induction du gène Bcl-2. La protéine LMP2A présente dans sa région N-terminale des motifs ITAM similaires à ceux présents sur le BCR. Ces motifs permettent l'inhibition des voies de signalisation du BCR ce qui empêche l'induction du cycle productif par la stimulation du BCR. Par ailleurs, LMP2A a été décrite comme pouvant fournir les signaux de survie cellulaire induit normalement par le BCR. Cette prolifération induit la formation du centre germinatif (CG) et plus particulièrement de la zone sombre.

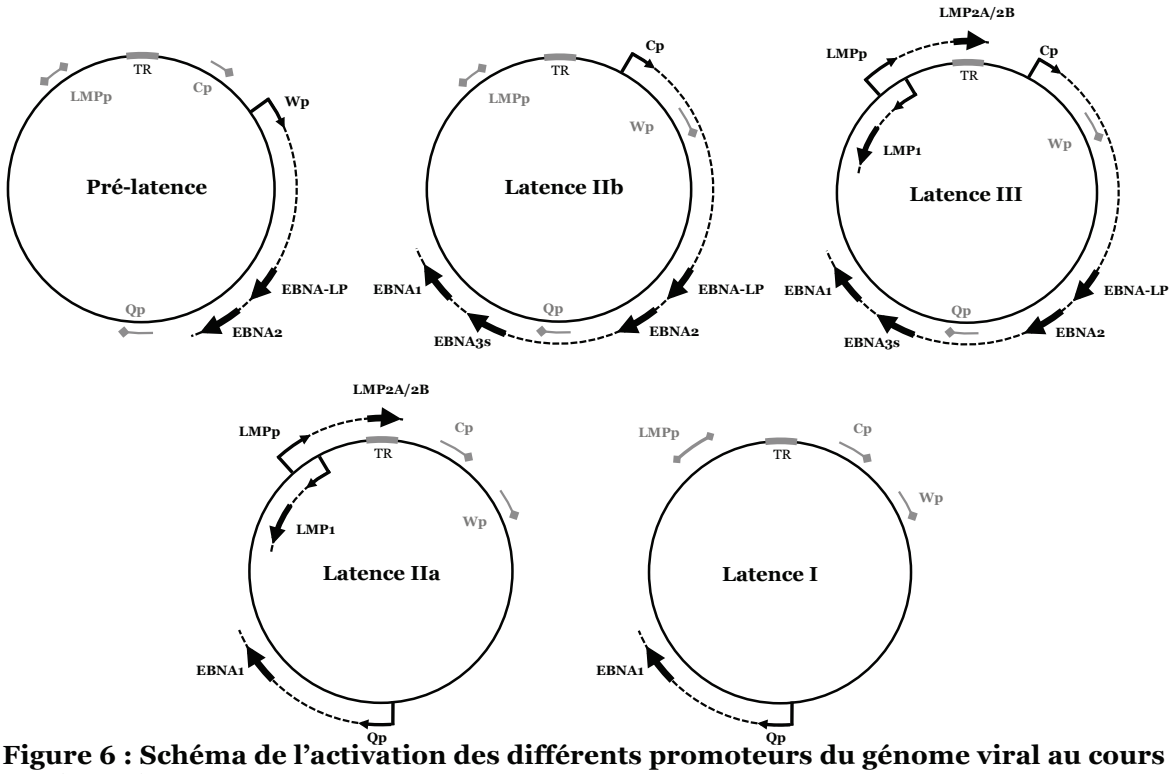


Figure 6 : Schéma de l'activation des différents promoteurs du génome viral au cours de l'infection

Les promoteurs actifs sont représentés par des flèches noires, inactifs en gris. Les régions codantes sont représentées par des flèches noires épaisses, les pointillés correspondant aux transcrits primaires issus des promoteurs. TR : Terminal Repeats.
La phase de pré-latence se caractérise par l'expression de gènes du cycle productif du virus qui est progressivement inhibée. L'accumulation des proteines EBNA-LP et EBNA2 induit l'activation du promoteur Cp et l'entrée en latence IIb. La latence IIb induit la migration du lymphocyte B. L'expression du programme de latence III est concomitante avec le début de la phase de prolifération du lymphocyte B. La transition latence III vers une latence IIa permet la maturation du lymphocyte dans le centre germinatif. Enfin, la cellule B mémoire résultant de cette maturation présente un profil de latence 0 (aucune protéine produite) ou latence I lorsque la cellule se divise.

*b. Maturation du lymphocyte B et mise en place de la latence virale (**figure 7**)*

Les étapes du devenir de ces lymphocytes B infectés par EBV ne sont pas encore clairement élucidées, cependant un modèle cohérent se dégage au vu des données disponibles et du parallèle avec la biologie du lymphocyte B activé par un antigène. Après l'étape de prolifération, le lymphocyte B peut suivre 2 voies :

- rester dans la zone sombre sous forme de cellule plasmablastique
- migrer dans la zone claire du centre germinatif et poursuivre sa maturation.

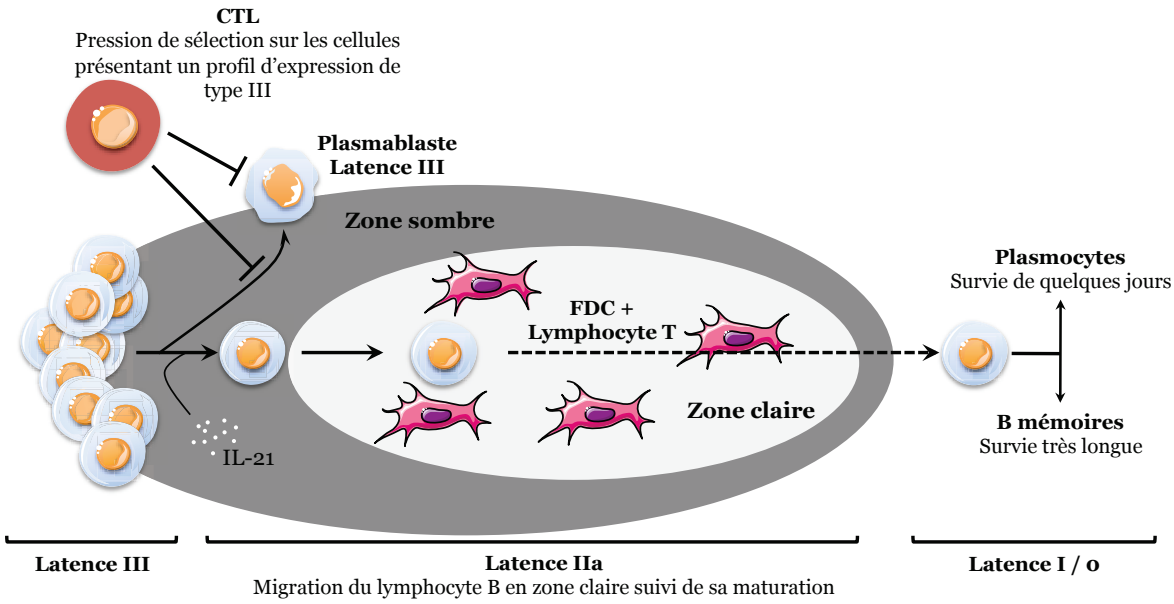


Figure 7 : Maturation du lymphocyte B infecté dans le centre germinatif

La progression de la maturation du lymphocyte B infecté nécessite la transition d'une latence III vers une latence IIa. La présence d'IL21 ainsi que d'une pression de sélection des CTL permettraient de selectionner les cellules infectées ayant effectuées cette transition. Le profil de latence IIa permet la migration du lymphocyte de la zone sombre à la zone claire. En zone claire, le lymphocyte B subit une maturation imposée par les FDC et les lymphocytes T. La survie du lymphocyte B infectée est dépendante des protéines LMP1 et 2 notamment, mais les mécanismes restent encore inconnues. À la sortie du centre germinatif, le lymphocyte B mature peut suivre deux voies : plasmocytaire ou mémoire. Le maintien à long terme du virus se fait dans les cellules B mémoires qui possèdent une longue durée de vie.

La voie suivie est dépendante de l'expression de divers marqueurs cellulaires qui est elle-même dépendante du profil d'expression viral et notamment du passage de la latence III à la latence IIa. L'interleukine-21 (IL-21), présente au sein des centres germinatifs, a été décrite comme étant impliquée dans l'inhibition du promoteur Cp, sans interférer avec l'activité du promoteur Qp (permettant l'expression de la protéine EBNA1 seule ; Kis *et al.* 2010). Ainsi l'expression des EBNA3, d'EBNA2 et d'EBNA-LP se trouve inhibée sans que les capacités réplicatives du virus ne soient altérées. Les cellules n'effectuant pas la transition latence III vers IIa seraient la cible de lymphocytes T cytotoxiques (CTL) spécifiques des protéines EBNA3. De par leur activité cytotoxique, ces CTL imposeraient une pression de sélection sur les lymphocytes B, favorable au maintien des cellules poursuivant le processus de maturation au sein du GC. L'une des clés permettant aux cellules B de quitter la zone sombre est l'inhibition de la protéine EBI-2. Dans le cas d'une activation classique du lymphocyte B, cette inhibition est effectuée par la protéine Bcl-6 qui bloque la transcription du gène *Ebi2*.

Dans le cas de l'infection virale, l'inhibition d'EBI-2 serait dépendante à la fois de la voie Bcl-6, régulée par la balance entre LMP1 et LMP2, mais également *via* l'inhibition de l'expression d'EBNA2 (Pereira, Kelly, et Cyster 2010 ; Panagopoulos *et al.* 2004). La zone claire est le siège d'une sélection drastique des lymphocytes B par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les lymphocytes T. L'expression des protéines LMP1 et LMP2A permet de mimer les signaux de survie cellulaire portés par le CD40 et le BCR (Thorley-Lawson 2001), mais les mécanismes permettant aux cellules B infectées par EBV de traverser cette zone pour émerger sous forme de plasmocytes ou cellules B mémoires ne sont pas encore déterminés. Au final, les lymphocytes B mémoires circulant issus de cette infection présentent un profil de latence 0 (aucune expression de protéine virale) ou latence I (expression de la protéine EBNA1) lors d'un événement de division cellulaire. Ces lymphocytes, siège de la persistance, représentent entre 1 à 100 cellules pour 1 000 000 de cellules, variant en fonction de l'individu. Les mécanismes de maintien du génome viral en latence seront développés ultérieurement.

c. *Infection des cellules épithéliales et transmission*

Des épisodes de réactivation virale conduisent à la production de nouvelles particules virales qui permettent la propagation du virus. L'activation de la cellule B, par la stimulation du BCR *via* un antigène, induit la différentiation en plasmocyte et déclenche la réactivation virale (Laichalk et Thorley-Lawson 2005 ; le cycle productif sera développé plus en détail ultérieurement). D'autres stimulations semblent également susceptibles d'activer le cycle productif comme le TGF-β, l'interaction entre un lymphocyte T et le lymphocyte B infecté au travers du signal CD4, mais également des stress cellulaires. Une caractéristique intéressante des virions produits par les lymphocytes B se trouve dans la composition en glycoprotéines d'enveloppe. En effet, la présence du CMH-II à la surface de la cellule B va limiter la présence de la glycoprotéine gp42 à la surface de la particule virale. Cette glycoprotéine est essentielle à l'infection des lymphocytes B de par son rôle de co-facteur. Ainsi, il a été montré que les virions produits par les lymphocytes B ont un tropisme préférentiel pour les cellules épithéliales (Borza et Hutt-Fletcher 2002). Les cellules épithéliales de l'oropharynx et des amygdales sont le siège d'une très forte production de virions, enrichis en glycoprotéine gp42, que l'on retrouve ensuite dans la salive. Ces virions, aptes à infecter des lymphocytes B naïfs, peuvent ré-infecter l'hôte ou être transmis à un nouvel hôte (Hadinoto *et al.* 2009). Cependant les mécanismes liés à l'infection de ces cellules épithéliales restent encore flous. De nombreux papiers ont notamment bien démontré la corrélation entre la différenciation de la cellule épithéliale et l'activation du cycle viral productif (Young *et al.* 1991; Reusch *et al.* 2015), cependant aucune protéine de la latence n'a été observée au sein d'un épithélium. C'est pourquoi un modèle proche du maintien du papillomavirus, caractérisé par l'absence

d'expression de gènes viraux avant la différenciation de la cellule, puis l'induction du cycle productif durant cette différenciation, a été avancé mais pas encore démontré.

d. Autres cibles du virus d'Epstein-Barr

Le tropisme du virus d'Epstein-Barr ne se limite pas aux cellules épithéliales de l'oropharynx ou encore aux lymphocytes B. En effet EBV infecte également une grande variété de cellules immunitaires comme les lymphocytes T, les cellules NK ou encore les monocytes. Les mécanismes d'infection de ces types cellulaires ne sont pas encore clairement établis. Outre le rôle probable du récepteur CD35 (Ogembo *et al.* 2013), d'autres hypothèses ont été proposées par le passé. Le récepteur CD21 ainsi que le co-récepteur CMH-II ont été montrés comme exprimés à la surface des lymphocytes T mais également de certains monocytes (Groux *et al.* 1997; Revoltella *et al.* 1989; Masy *et al.* 2002). Dans le cas des cellules NK, la formation d'une synapse immunologique avec le lymphocyte B pourrait être à l'origine de l'infection (Kaneko *et al.* 1995; Tabiasco *et al.* 2003).

e. Infection in vitro

L'infection de lymphocytes B primaires par EBV conduit à leurs immortalisations après 1 mois de culture. Les lignées résultantes présentent un profil de latence III et sont appelées lignées lymphoblastoïdes (*Lymphoblastoid Cell Line* – LCL). L'infection reproduit les étapes de l'infection *in vivo* jusqu'à l'arrivée du lymphocyte B au follicule et l'initiation de la prolifération. L'absence de CTL et de l'IL-21 notamment empêche le passage de la latence III vers la latence II. Ce modèle cellulaire est largement utilisé dans l'étude du rôle des protéines de latence dans la prolifération et la survie cellulaire.

3. Cycle productif du virus d'Epstein-Barr

La production de nouveaux virions durant le cycle productif permet le maintien du virus au sein de l'hôte, mais également la transmission inter-humaine. L'étude du cycle productif se fait principalement dans 2 types cellulaires : les cellules épithéliales infectées par un virus recombinant (HEK-293) ou des lignées dérivées de lymphome de Burkitt (P3HR.1, Akata). Ces modèles se rapprochent le plus des cellules productrices du virion *in vivo* que sont les cellules de l'oropharynx et les lymphocytes B. Le cycle productif des herpesvirus se caractérise par l'expression successive des gènes immédiats précoces, précoces puis tardifs (**figure 8**).

a. Induction du cycle et expression des gènes immédiats précoces

Comme discutée plus haut, l'activation du cycle productif *in vivo* est directement liée à la différentiation/activation du lymphocyte B infecté en plasmocyte, suite à son interaction avec son antigène, un lymphocyte T ou encore des IgA. Dans un contexte *in vitro*, le cycle

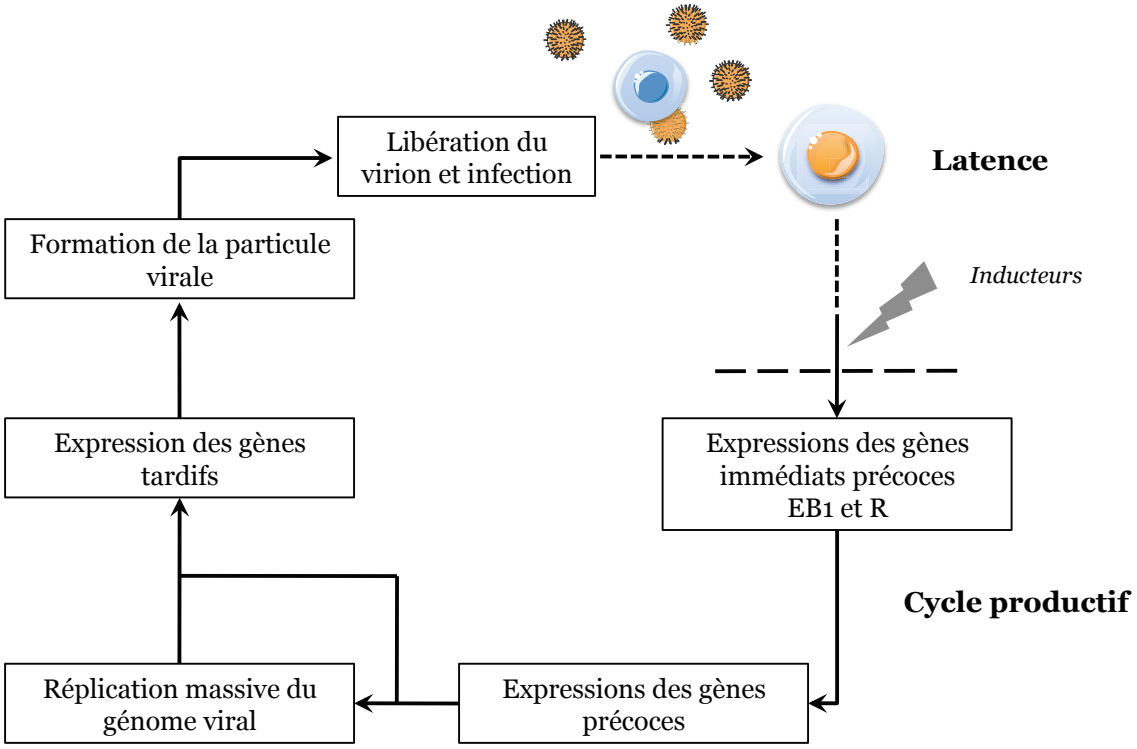


Figure 8 : Schéma des principales étapes du cycle productif du virus Epstein-Barr

L'induction du cycle productif provoque l'expression des gènes immédiats précoces EB1 et R qui activent l'expression des gènes précoces. L'expression des gènes précoces permet la réplication du génome viral. Les gènes tardifs sont exprimés à la suite de la réplication du génome viral et sous contrôle de certains gènes précoces (vPIC). L'ADN viral est encapsidé, le virion acquiert sa membrane en bourgeonnant au niveau de l'appareil de Golgi, pour ensuite être exporté par le réseau trans-golgien et libéré dans le milieu extra-cellulaire.

productif peut être induit par un cocktail de deux composés chimiques que sont le TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) et l'acide butyrique. Également, lorsque le modèle cellulaire étudié le permet, la transfection d'un plasmide codant pour la protéine virale immédiate précoce EB1 permet d'induire le cycle productif. Enfin, l'engagement du BCR par un anticorps anti-IgG ou IgM représente la voie la plus physiologique, mais n'est efficace que sur un nombre restreint de lignées cellulaires comme la lignée Akata.

De nombreux facteurs cellulaires sont impliqués dans l'induction du cycle productif comme la protéine BLIMP1, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire, capable d'induire l'expression des deux gènes immédiats précoces EB1 (ZEBRA / Zta) et R (Rta), point de départ du cycle productif (Reusch *et al.* 2015).

EB1 et R sont deux facteurs de transcription capables d'une part d'activer leurs propres promoteurs (Zp et Rp respectivement) mais surtout d'induire l'expression des gènes précoces du cycle productif soit en agissant en tandem soit indépendamment l'un de l'autre (Swenson, Holley-Guthrie, et Kenney 2001; Feederle *et al.* 2000). La contribution de R et EB1 à l'induction du cycle ne semble pas être équivalente dans un contexte lymphocytaire. En effet dans les LCL ou encore la lignée Raji, seule la protéine EB1 est capable de faire entrer la cellule en cycle productif (Zalani, Holley-Guthrie, and Kenney 1996 ; Manet, Sergeant, and

Gruffat 2003 ; Chevallier-Greco *et al.* 1986). Au delà du rôle d'induction/amplification du cycle productif, EB1 et R agissent également sur la transcription de gènes cellulaires (Cayrol et Flemington 1995), la réplication du génome viral (Sarisky *et al.* 1996 ; Zhang *et al.* 1996), le cycle cellulaire (Mauser *et al.* 2002 ; Swenson *et al.* 1999) ou encore la réponse immunitaire (Morrison *et al.* 2001).

b. Rôles des gènes précoces dans la réplication et la régulation des gènes tardifs

Les gènes précoces peuvent être classés en 3 groupes de fonctions :

- survie et échappement immunitaire
- réplication du génome viral
- expression et régulation des ARNm viraux et cellulaires

Les gènes responsables de la survie et de l'échappement immunitaire sont les mêmes que ceux exprimés lors de la phase de pré-latence : BHRF1 et BARF1.

La réplication permet une amplification importante du génome viral qui est ensuite encapsidé et incorporé dans une particule virale mature. Comme l'ensemble des herpesvirus, EBV possède sa propre ADN polymérase codée par le gène BALF5, ainsi que de nombreux facteurs impliqués dans les étapes d'initiation et d'élongation. L'origine de réplication du cycle productif, oriLyt, est le plus souvent présente en deux copies par génome et se compose de nombreux sites d'interactions pour EB1 et R notamment. La réplication du génome se fait vraisemblablement suivant un modèle de cercle roulant, et les génomes néo-synthétisés, à l'inverse des épisomes, sont dépourvus de marqueurs chromatiniens.

De nombreux gènes précoces régulent l'expression de gènes cellulaires ou viraux. Par exemple BMRF1 active la transcription du gène BHLF1 ; BRRF1 augmente la fonction activatrice de la protéine cellulaire c-jun. La protéine EB2 (nommée également : BMLF1, Mta, SM) joue un rôle majeur dans la maturation, l'export, la traduction et la stabilité des ARNm sans intron, notamment viraux. Enfin, 6 protéines virales (BcRF1, BGLF3, BFRF2, BDLF4, BDLF3.5 et BVLF1) forment un complexe de pré-initiation de transcription viral (vPIC) qui permet l'expression de la plupart des gènes viraux tardifs (Aubry *et al.* 2014).

c. Étapes tardives : formation de la particule virale et sortie du virion

L'expression des gènes viraux tardifs requiert la réplication de l'ADN viral et est régulée par le vPIC. Les gènes tardifs codent pour des constituants de la capside, du tégument, de l'enveloppe ou encore des protéines participant à la formation et la maturation de la particule virale. Le gène BCRF1 (codant la protéine vIL-10) est également exprimé, permettant de limiter la réaction immunitaire.

L'assemblage de la capside virale, dont les capsomères sont formés par les protéines du complexe VCA (Viral Capsid Antigen) et les protéines BDLF1 et BORF1, a lieu dans le noyau

de la cellule (W.-H. Wang, Chang, et Liu 2011). L'encapsidation du génome viral se fait sous contrôle du complexe *terminase*, formé par les protéines BGRF1, BDRF1 et BALF3, qui permet à la fois d'individualiser les génomes néo-synthésisés par son activité nucléase (portée par BALF3) mais aussi d'encapsider le génome viral (Chiu *et al.* 2014). La reconnaissance des TR par le complexe *terminase* permet une hydrolyse précise et correcte des concatémères viraux. Les mécanismes d'acquisition de l'enveloppe n'ont pas été décrits pour EBV, cependant il semble que ceux décrits pour le virus HSV1 puissent s'appliquer à EBV. Dans un premier temps, la capside bourgeonne au niveau de la membrane nucléaire interne, traverse l'espace périnucléaire pour être libérée dans le cytoplasme, soit au niveau de la membrane nucléaire externe, soit au niveau du réticulum endoplasmique. Cette enveloppe est riche en protéines gp42 même dans les lymphocytes B, alors que la particule virale provenant de ces lymphocytes B en est dépourvue, c'est pourquoi un bourgeonnement secondaire est supposé comme pour le virus HSV1. Le tégument se forme autour de la capside, avant le second bourgeonnement qui a lieu avec les membranes de l'appareil de Golgi, permettant au virion d'acquérir son enveloppe définitive et l'ensemble de ses glycoprotéines. Finalement la particule virale rejoint la voie d'exocytose du Golgi et est transportée dans une vésicule qui fusionne à la membrane plasmique pour libérer la particule virale (Johnson et Baines 2011).

III. Physiopathologie du virus d'Epstein-Barr

La capacité d'EBV à infecter et à se maintenir dans 90 % de la population mondiale sans induire de pathologie, dans la majeure partie des cas, en fait un virus hautement adapté à son hôte. Le développement d'une pathologie viro-induite repose sur des mécanismes complexes et le rôle du pathogène est difficile à définir précisément. Concernant les pathologies liées au virus d'Epstein-Barr, deux facteurs clés peuvent être mis en avant : la capacité du virus à immortaliser les cellules qu'il infecte et la capacité du système immunitaire à contrôler ces cellules infectées.

1. La mononucléose infectieuse (MNI ; Balfour, Dunmire, et Hogquist 2015)

Comme décrite précédemment, la primo-infection a lieu le plus souvent lors des premières années de la vie, de manière asymptomatique. Dans le cas d'une primo-infection lors de l'adolescence, 1/3 des patients développent une forme symptomatique : la mononucléose infectieuse plus couramment nommée « la maladie du baiser ». Le rôle d'EBV comme agent étiologique de la MNI a été établi en 1967 dans le laboratoire des Henle, grâce à un événement de séro-conversion pour EBV d'un membre de l'équipe de recherche et le développement concomitant d'une MNI (Epstein et Achong 1973). D'un point de vue épidémiologique, la MNI n'est pas restreinte géographiquement, cependant son incidence est

plus élevée dans les pays développés, vraisemblablement à cause d'une acquisition plus tardive du virus que dans les autres régions. Le développement de cette pathologie, principalement chez le jeune adulte, peut s'expliquer de diverses manières :

- une quantité de virion transmise lors d'un baiser amoureux plus importante que par un objet souillé ou un simple baiser lors de l'enfance

- une maturité du système immunitaire différente (rôle des lymphocytes T_{CD8^+} et des cellules NK notamment)

- l'absence de diagnostic chez les jeunes enfants.

La durée d'incubation se situe entre 32 et 49 jours selon les individus dont les symptômes se caractérisent par une pharyngite, un gonflement important des ganglions cervicaux, de la fièvre et une grande fatigue qui peuvent durer de 2 semaines à plusieurs mois. L'apparition des signes cliniques s'accompagne d'un haut titre viral, de la production d'IgM dirigées contre les protéines de la capside et d'une expansion massive de lymphocytes T $CD8^+$. La quantité brute de cellules T $CD8^+$ est 35 à 300 fois plus importante dans le cas d'une MNI que lors d'une infection asymptomatique, et environ 50 % de ces lymphocytes T $CD8^+$ sont spécifiques pour des protéines virales (Hoshino *et al.* 1999). La majorité de ces lymphocytes entre ensuite en apoptose. La population restante va constituer la population de cellules mémoires responsables du contrôle du virus lors notamment de l'activation du cycle productif.

2. EBV et cancers (voir Cesarman 2014)

Le virus d'Epstein-Barr est également connu pour son association avec de nombreuses pathologies tumorales, à la fois chez des patients immunocompétents et immunodéprimés, classées par l'OMS en 2008 (Campo *et al.* 2011). Une étude épidémiologique publiée en 2014 (Khan et Hashim 2014) a recensé la mortalité liée aux pathologies associées à EBV. Ainsi en 2010 plus de 142 000 décès sont associés à des cancers induits par EBV, ce qui représente environ 1,8 % de cas tous cancers confondus. Ces chiffres semblent faibles comparés à la prévalence de l'ordre de 90 % du virus au sein de la population mondiale. Un modèle de développement de tumeur EBV^+ a été établi en se basant sur le cycle viral : en conditions « normales », le virus se maintient dans les cellules B mémoires, cependant un/des évènements particuliers venant modifier le cycle naturel du virus ou la physiologie de la cellule hôte peuvent être le point de départ d'une pathologie. Le modèle développé par Thorley-Lawson *et al.* (Thorley-Lawson 2005) relie le profil d'expression viral au cours de la maturation du B naïf en B mémoire lors de l'infection, avec le profil d'expression de chaque pathologie. Il est ainsi possible de spéculer qu'un défaut lors du cycle viral puisse être le point de départ du développement malin (**figure 9**). L'impact du virus sur le processus de tumorigenèse n'est pas clairement établi, cependant son rôle principal pourrait être de

fournir des signaux de survie et de prolifération aux cellules, phénomènes clés dans le développement de pathologies tumorales.

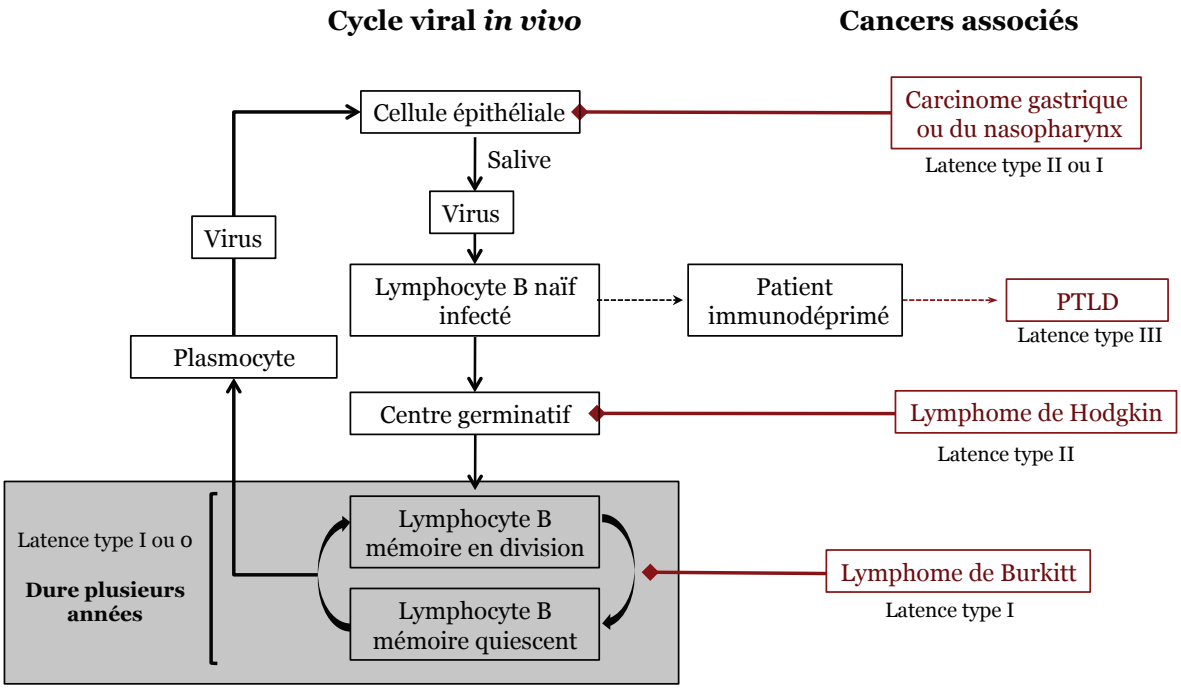


Figure 9 : Modèle établissant un lien entre le cycle viral *in vivo* et le développement de cancers associés à EBV

Les différentes étapes de l'infection sont résumées par les encarts noirs. Brièvement, un virion présent dans la salive infecte un lymphocyte B naïf, cette infection déclenche sa migration au niveau du centre germinatif, lieu de sa maturation. Le lymphocyte B mémoire résultant de cette infection persiste dans le sang circulant pendant une longue période (plusieurs mois). Des épisodes de réactivations induisent la formation de nouvelles particules virales Ces virions infectent les cellules épithéliales, siège de la production des virions présents dans la salive. En rouge sont représentées les différentes pathologies associées présentant le profil de latence identique à l'étape du cycle viral a laquelle elles sont associées.

a. Carcinome du Rhinopharynx (Nasopharyngeal Carcinoma - NPC)

L'étiologie du NPC est diverse, incluant le fond génétique, les facteurs environnementaux (régime alimentaire) et dans 100 % des cas l'association avec le virus d'Epstein-Barr. L'incidence du NPC est fortement marquée dans les pays d'Asie du Sud-Est (avec des moyennes de 15 à 30 cas pour 100 000 habitants), en Afrique du Nord et chez les Inuits d'Alaska, contrairement aux autres régions du monde avec une incidence inférieure à 1 cas pour 100 000 personnes.

Dans un contexte sain, l'infection d'une cellule épithéliale par le virus d'Epstein-Barr induit l'activation du cycle productif et une lyse de la cellule infectée sans mise en place de latence. Une altération génétique de la cellule *a priori* de l'infection pourrait conduire à l'établissement du cycle latent d'EBV (latence de type II) avec l'expression des protéines

LMP1 et 2 capables d'affecter le comportement prolifératif de la cellule (Yoshizaki *et al.* 2012). LMP1 modulerait les voies d'apoptose en activant la voie NF-κB induisant l'expression de gènes anti-apoptotiques (Hatzivassiliou et Mosialos 2002). De plus, l'activité de la protéine p16, une kinase dépendante des cyclines régulant l'activité de cdk4, est diminuée, ce qui favorise la transition entre la phase G1 et la phase S. Cette inhibition, induite par LMP-1, peut-être d'une part le résultat de l'hyperméthylation du gène par le complexe c-Jun/JunB (Song *et al.* 2004) ou de la translocation vers le cytoplasme des facteurs de transcription Ets2 et E2F4/5 régulant le gène p16 (Ohtani *et al.* 2003).

Dans le cas du NPC, la détection du génome viral dans le sang de patients est un outil diagnostic puissant. La charge virale est directement corrélée avec l'avancement de la pathologie et sert de suivi au long terme après traitement : une charge virale faible est observée dans le cas de patients en rémission ; à l'inverse une charge virale élevée est un facteur de mauvais pronostique souvent précurseur d'une rechute (Lo 2001).

b. Lymphome de Hodgkin (HL)

Le lymphome de Hodgkin se caractérise par une faible proportion de cellules malignes dites de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) au sein de la tumeur. En effet les cellules HRS ne représentent que 1 % de la masse tumorale. Les 99 % restant sont composés d'infiltrats de cellules immunitaires comme des lymphocytes, éosinophiles, neutrophiles et fibroblastes (Campo *et al.* 2011). L'association entre le lymphome de Hodgkin et le virus d'Epstein-Barr peut atteindre 40 % (Bräuninger *et al.* 2006). La clonalité du virus ainsi que sa présence dans l'ensemble des cellules HRS attestent d'une infection antérieure au développement de la pathologie et est en faveur d'un rôle fort du virus dans son incidence. Les HRS ont une origine de cellule B, bien que la majorité des marqueurs liés à cette population aient disparu de la cellule (CD20, CD19, Ig de surface…). Les cellules HRS au sein d'une tumeur présentent le même réarrangement concernant les chaines lourdes d'Ig, mais des mutations somatiques distinctes, traduisant une origine à partir d'un précurseur commun ayant dérivé lors de sa maturation au sein du centre germinatif. Le point de départ caractéristique des cellules HRS est l'absence d'un BCR fonctionnel à la surface du lymphocyte B, ce qui conduit normalement à son apoptose au sein du centre germinatif. Les cellules HRS dépourvues de BCR développent un mécanisme d'échappement à cette mort programmée. De nombreux facteurs sont impliqués dans cet échappement, comme l'activation constitutive des voies NF-κB et JAK-STAT ou encore la surexpression du miRNA 155. Dans les HL EBV positifs, l'expression des gènes de latence II (EBNA1, LMP1-2, EBER1-2 et les miRBARTs) procurerait les signaux de survie nécessaires à l'échappement à l'apoptose liée à une déficience en BCR (pour une revue voir Farrell and Jarrett 2011).

c. *Lymphome de Burkitt (BL)*

La première description d'une forme de Lymphome de Burkitt date de 1896 par Albert Cook qui rapporta le cas d'un enfant en Ouganda ayant une large tumeur maxillaire, vraisemblablement un BL. Cependant, c'est à Denis Burkitt, en 1958, que l'on doit la description et la caractérisation précises du BL, ce qui a permis la découverte quelques années plus tard de l'EBV. L'OMS a classé le BL en trois formes distinctes :

- endémique : région sub-saharienne endémique pour le paludisme (Afrique équatoriale, Papouasie Nouvelle-Guinée)
- sporadique : Europe, Etats-Unis, Asie
- associée au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH).

Le taux d'association avec EBV est différent pour chaque forme : pour la forme endémique il est virtuellement de 100 %, 20 % pour la forme sporadique et 30 % pour la forme associée au VIH. Le point commun, entre ces formes, est la présence d'une translocation du gène *C-MYC*, sur le chromosome 8, devant le promoteur d'une chaine lourde ou légère (κ ou λ) d'immunoglobuline (chromosomes 14, 2 ou 22 respectivement ; Klein 1983), induisant une surexpression du gène et donc une prolifération rapide des cellules (Polack *et al.* 1996 ; Hecht et Aster 2000). Le BL présente les marqueurs de lymphocytes B du CG ($CD10^+$, $BCL6^+$ et $BCL2^-$) traduisant l'acquisition d'un phénotype malin durant la maturation du B. Notamment, l'activation aberrante de la protéine AID (Activation-Induced Deaminase), responsable de la commutation de classe, serait à l'origine de la translocation du gène *C-MYC* (Goossens, Klein, et Küppers 1998) ou encore de mutations au sein de ce gène, fréquentes dans le Lymphome de Burkitt. D'autres altérations génétiques associées au BL ont été décrites, comme des variations alléliques pour les gènes *TCF3*, *ID3, CCND3 etc.* (Schmitz *et al.* 2012). De manière notable les BL EBV négatifs présentent plus d'altérations que lorsque le virus est associé à la tumeur (Giulino-Roth et Cesarman 2013).

Cependant l'impact du virus dans le cas de BL reste flou. En effet le BL présente une latence de type I au cours de laquelle seule la protéine EBNA1 et les ARN non codants, miRBART et EBER, sont exprimés, sans que leurs rôles exacts ne soient définis. Une hypothèse, celle du *hit and run*, serait qu'un profil de latence III soit à l'origine de la mise en place du phénotype malin et que ce profil d'expression disparaisse (notamment par une pression de sélection des lymphocytes T) au profit d'une latence de type I qui participerait au maintien de ce phénotype. En effet un profil de latence III au sein de BL antagonise l'effet oncogène induit par *C-MYC* (Pajic *et al.* 2001). Cependant la présence du virus au sein de la tumeur est primordiale : des lignées dérivées de lymphome de Burkitt sont plus sensibles au phénomène d'apoptose lorsqu'une perte du génome virale est induite (Vereide et Sugden 2011). Des travaux suggèrent notamment le rôle des ARN EBER dans la résistance au phénomène d'apotpose (Nanbo et Takada 2002) mais aussi dans le maintien de la

prolifération du B *via* l'induction de l'expression de l'IL-10 (Kitagawa *et al.* 2000). La corrélation géographique entre la forme endémique 100 % positive pour EBV et les zones paludéennes suggère un rôle synergique entre ces deux pathogènes dans le développement de BL. Deux hypothèses, non exclusives, sont avancées, la première consiste en une activation chronique du système immunitaire due au paludisme induisant un épuisement du système immunitaire et ainsi une diminution de l'immunosurveillance médiée par la population de lymphocytes T (Wykes *et al.* 2014). La seconde se rapporte à l'induction du cycle productif d'EBV par des constituants de *Plasmodium Falciparum,* ce qui augmenterait la charge virale et donc le nombre de cellules B infectées, et le risque de développement d'un BL (Moormann, Snider, et Chelimo 2011 ; Grömminger, Mautner, et Bornkamm 2012).

d. PostTransplantation Lymphoproliferative Disorder (PTLD)

Le PTLD est un exemple typique de pathologie issue du développement de la médecine moderne et plus précisément du développement de la transplantation d'organe. Les premiers syndromes du post-transplanté ont été décrits entre 1968 et 1969 et sont directement reliés à l'utilisation d'immunosuppresseurs. Le syndrome du post-transplanté n'est pas restreint à une forme clinique, mais peut se présenter sous différents aspects. Ainsi l'OMS classe le PTLD en 3 catégories en fonction du type de lésion morphologique observé : lésion bénigne polyclonale précoce, PTLD polymorphique, PTLD malin monomorphique monoclonal (Campo *et al.* 2011). De plus, chaque catégorie présente des spécificités histologiques propres qui peuvent être similaires à celle d'un syndrome mononucléosique, d'un lymphome de Hodgkin ou encore d'une lymphoprolifération de type néoplastique (voir Morscio, Dierickx, and Tousseyn 2013 pour plus de détails).

Les mécanismes de développement des PTLD, de par leurs diversités phénotypiques, restent encore majoritairement incompris. Cependant, il a été identifié de nombreux facteurs de risques impliqués dans la pathogenèse. Le type d'organe transplanté (Dharnidharka 2010), le statut immunologique du patient face au virus EBV et l'âge du patient représentent des éléments clés. En effet les organes transplantés nécessitant une forte utilisation d'immunosuppresseurs (transplantation cardiaque) ou possédant de nombreux tissus lymphoïdes (intestin) présentent une incidence accrue pour le développement de PTLD (Murukesan et Mukherjee 2012). Également, la transplantation d'un organe contenant des cellules B infectées par EBV dans un receveur immunitairement naïf pour EBV représente un facteur majeur de développement de PTLD, notamment chez les enfants, traduisant un rôle important du virus dans le développement de la pathologie (voir Green et Michaels 2013 pour plus de détails).

L'incidence d'EBV au sein de PTLD varie de 1 % à 20 %, cette proportion étant plus importante dans le cas de PTLD survenant dans l'année suivant la transplantation. D'un

point de vue mécanistique, lors de la maturation du B naïf infecté par EBV, les lymphocytes T cytotoxiques contrôlent la prolifération des cellules B infectées exprimant notamment le programme de latence III. Un défaut de surveillance, lié au traitement immunosuppresseur ou à un état naïf du système immunitaire face à EBV, serait à l'origine du PTLD. Lucas *et al.* suggèrent qu'une faible activité cytotoxique dirigée contre EBV serait associée à un fort risque de PTLD(Lucas *et al.* 1996). Cette activité cytotoxique revient progressivement au cours du temps avec un retour à la normale après 1 année, corrélant avec l'incidence de PTLD EBV^+ (transplantation d'organe : 22 cas / 10 000 patients l'année de l'opération, 5 cas / 10 000 patients l'année suivante).

e. Autres pathologies tumorales liées à EBV

EBV infecte également des cellules T, NK, épithéliales *etc,* et dans certains cas se retrouve associé à des pathologies tumorales avec une incidence plus ou moins élevée. Certaines de ces pathologies sont résumées ci-dessous, la liste n'étant pas exhaustive. De plus il n'est pas exclu qu'EBV soit associé, de manière plus marginale, à d'autres syndromes dont l'étiologie reste à l'heure actuelle inconnue.

EBV est associé à de nombreuses lymphoprolifération de cellules NK/T souvent agressives notamment en Asie et dans les populations natives d'Amérique centrale. La classification de ces pathologies a beaucoup évolué ces dernières années : les lymphomes prototypes sont le lymphome extra-nodal NK/T (ENKL), la leucémie agressive à cellule NK (ANKL), le syndrome d'activation chronique du virus EBV (CAEBV) et la lymphoprolifération à cellule T EBV positive de l'enfant. Ces pathologies se caractérisent soit par une expansion de cellules T ou NK EBV positives (ANKL, lymphoprolifération à cellule T EBV positive) soit par l'infiltration de cellules immunitaires (ENKL, lymphome nodal à cellule NK/T). La diversité des symptômes de ces lymphoprolifération ainsi qu'un manque de connaissances relatives aux mécanismes de tumorigenèse font l'objet de nombreux débats et études (pour une revue voir Park and Ko 2014).

En 1975 Purtilo *et al.* décrivent chez des patients masculins une forte déficience immunitaire conduisant à une prolifération lymphocytaire, une histiocytose et une hypogammaglobulinémie (Purtilo *et al.* 1975). Historiquement nommée la maladie de Duncan elle est rebaptisée lymphoprolifération liée à l'X (XLP – X-linked LymphoProliferative disorder ; pour une revue complète voir Tangye 2014). Sur les 6 cas issus de la même famille, décrits par Purtilo, 3 ont délenché un syndrome mononucléosique fulminant lié au virus d'Epstein-Barr en plus des symptômes décrits ci-dessus. L'étiologie est une mutation sur le chromosome X du gène *SH2D1A*, codant la protéine SAP impliquée dans la régulation des signaux transduits par les récepteurs de la famille des SLAM. Une déficience pour la protéine SAP induit une perte de réponse des cellules NK, $CD8^+$ et $CD4^+$ envers un

lymphocyte B infecté, mais également une absence de cellule NKT. Lors d'une infection par EBV, l'absence d'activité cytotoxique contre les cellules B infectées peut induire un syndrome mononucléosique fulminant et une prolifération lymphocytaire importante non contrôlée. Le rôle d'EBV dans le développement d'un XLP est directement corrélé à sa capacité à infecter exclusivement les cellules B de manière latente. Cependant, l'incidence de l'hypogammaglobulinémie ou l'apparition d'un lymphome dans le cas d'un XLP ne sont pas corrélées avec la présence d'EBV. Il existe actuellement deux formes d'XLP, la forme 1 décrite ci-dessus, et la forme 2 (appelée XIAP). Celle-ci présente un tableau clinique proche de la forme XLP-1, à la différence que le gène impliqué situé sur le même locus que *SH2D1A* est le gène *XIAP* (pour une revue voir Latour and Aguilar 2015).

Le virus d'Epstein-Barr est également associé a environ 10 % des carcinomes gastriques à travers le monde. De manière intéressante les analyses histologiques des carcinomes gastriques EBV^+ présentent des caractéristiques uniques proche de celles d'un adénocarcinome peu différencié mais surtout une infiltration lymphocytaire similaire à ce que l'on observe dans le cas du NPC. Ce sous-type de carcinome gastrique présente un moindre risque de développement de métastase au niveau des ganglions lymphatiques et est associé à une plus faible mortalité. Au niveau de la tumeur, EBV est présent de manière monoclonale dans l'ensemble des cellules tumorales. L'infection de cellules primaires gastriques par EBV a été démontrée expérimentalement. Le profil de latence est le même que celui retrouvé au sein de la tumeur, à savoir un profil proche de la latence I exprimant EBNA1, les EBERs, les miRBARTs mais aussi LMP2A. L'expression de ces gènes va conduire à l'inhibition du gène *PTEN*, un gène suppresseur de tumeur, à l'inhibition de l'apoptose et une augmentation de la prolifération cellulaire de manière similaire à celle décrite précédemment pour d'autres pathologies (pour une revue voir (Nishikawa *et al.* 2014).

3. Stratégies thérapeutiques contre le virus d'Epstein-Barr

a. Traitement des pathologies tumorales associées au virus d'Epstein-Barr

De manière surprenante, la plupart des stratégies employées dans le traitement de pathologies associées à EBV n'ont pas pour cible EBV. Les traitements les plus récurrents sont l'emploi du rituximab qui induit l'apoptose des cellules B, la chimiothérapie ou encore une résection chirurgicale. Le ciblage du virus dans la prise en charge du patient n'est développé que dans les cas de résistances de la pathologie face aux traitements courants. Deux lignes de conduites sont actuellement développées dans le ciblage du virus dans un contexte tumoral. La thérapie cellulaire constitue l'une des approches qui a déjà fait ses preuves dans de nombreuses études cliniques (voir Tse et Kwong 2015 pour une revue). Une transfusion de cellules T cytotoxiques autologues réactives face à EBV a notamment été démontrée comme efficace dans le traitement de PTLD EBV^+ présentant une latence de type

III, que cela soit des suites d'une transplantation d'organe solide ou encore de cellules souches hématopoïétiques. Cette approche a également montré des résultats prometteurs dans le traitement de lymphome EBV^+ présentant un profil de latence de type II comme le lymphome de Hodgkin, le lymphome NK/T *etc.* Cependant la production des cellules T nécessaires au traitement requiert beaucoup de temps, ce qui implique une amélioration future pour une exploitation à plus grande échelle. La seconde se nomme « thérapie d'induction du cycle lytique » (Kenney 2006). Cette approche consiste à induire le cycle productif du virus à l'aide notamment d'inhibiteurs des HDAC (Histone DeAcetylase Complex), pour le bloquer ensuite en utilisant un analogue nucléosidique, le ganciclovir par exemple, ce qui conduit à un arrêt du cycle productif sans production de virion mais également à une mort cellulaire. Un essai clinique de 2007 regroupant 15 patients ne répondant pas aux traitements classiques a été réalisé en exploitant cette approche. Sur les 15 patients, 4 étaient en rémission totale et 6 en rémission partielle (Perrine *et al.* 2007). Ces résultats également prometteurs se doivent d'être approfondis notamment sur l'efficacité de réactivation par les inhibiteurs des HDAC qui reste encore peu caractérisée. De plus ces molécules n'induisent pas spécifiquement le cycle productif et conduisent à de nombreux effets secondaires.

b. Stratégie vaccinale contre le virus d'Epstein-Barr (voir Cohen 2015)

L'incidence du développement d'un HL est environ 30 % plus élevée chez des personnes ayant contracté une MNI, ainsi le développement d'un vaccin prophylactique permettrait de lutter en amont contre le Lymphome de Hodgkin (Hjalgrim *et al.* 2003). Un tel vaccin permettrait également de protéger les personnes à risque pour une MNI fulminante comme les garçons susceptible à un XLP. Bien qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun vaccin approuvé et disponible sur le marché pour prévenir ou traiter une infection par EBV, de nombreuses approches sont en cours d'étude. Les vaccins en cours de développement sont fondés sur la reconnaissance de la glycoprotéine gp350 (vaccin prophylactique) ou encore sur l'induction d'une réponse CTL (vaccin thérapeutique). Divers essais cliniques de phases I/II ont été réalisés avec des résultats encourageants : induction d'une réponse d'anticorps anti-gp350 pour une durée supérieure à 18 mois s'accompagnant d'une réduction de MNI de 78 %. Cependant cette approche vaccinale n'empêche pas l'infection. Concernant les essais sur des vaccins thérapeutiques, des résultats prometteurs ont été obtenus dans le traitement de patients atteints de maladie de Hodgkin et de NPC notamment.

Diverses approches n'ont pas encore donné lieu à des essais cliniques et sont encore en développement, comme l'induction de la présentation de protéines virales à la surface des cellules tumorales afin d'induire leur reconnaissance par le système immunitaire. D'autres

approches sont développées afin de bloquer le maintien du génome viral au sein de la cellule. Ces approches seront développées dans un chapitre ultérieur.

IV. Conclusion

La co-évolution, vraisemblablement très ancienne, entre les herpesvirus et leurs hôtes a conduit à l'émergence de virus hautement adaptés. Le virus d'Epstein-Barr exploite de manière remarquable les mécanismes de maturation des lymphocytes B afin d'établir une latence efficace et à vie au sein de l'hôte. Malgré cela, EBV est associé à de nombreuses pathologies, notamment tumorales, dans lesquelles il joue plutôt un rôle de co-facteur et non d'inducteur *per se*. Dans la plupart des cas, que cela soit pour le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, le NPC *etc*, le cycle « naturel » du virus se trouve perturbé et des protéines de latence se retrouvent exprimées dans des situations qui favorisent la prolifération et l'inhibition de l'apoptose de cellules devant normalement mourir.

Mécanisme de persistance du virus d'Epstein-Barr

Le maintien d'une souche virale dépend de nombreuses caractéristiques liées à la population cible d'une part, densité, promiscuité, fond génétique, mais également de l'interaction du pathogène avec cette population. La capacité d'infecter efficacement son hôte ou encore une exposition constante de l'hôte au pathogène font partie des divers mécanismes de persistance existant au sein du monde viral. L'une de ces stratégies consiste en une primo-infection, symptomatique ou non, suivie d'une persistance asymptomatique du virus au sein de l'individu infecté pendant une durée variant de quelques mois à plusieurs années. Cette stratégie ouvre une fenêtre de transmission aussi longue que dure la phase de persistance. Deux grands mécanismes de persistance ont été décrits : persistance par une infection chronique ou par une infection latente. Une infection chronique se caractérise par une production continue de particules virales infectant de nouvelles cellules sans pour autant causer de symptôme (HIV, HCV, HBV). À l'inverse une infection latente se caractérise par une production de particules virales lors d'épisodes de réactivations plus ou moins fréquents. Dans les 2 cas un équilibre entre l'infection virale et le système immunitaire s'établit. Une perturbation de cet équilibre peut induire le développement de symptômes s'accompagnant ou non d'une résurgence du virus.

L'objectif de cette partie est de donner une vision générale des systèmes de maintien de type latent, un accent particulier sera mis sur le mécanisme de latence du virus d'Epstein-Barr.

I. Mécanismes de persistance de virus latents

Les mécanismes de persistance d'un virus latent dépendent notamment du type cellulaire jouant le rôle de réservoir du virus. Dans le cas d'infection de cellules quiescentes, le mécanisme de maintien à long terme ne fait pas appel à la réplication du génome viral (hors cycle productif). À l'inverse, si le réservoir est soumis à des divisions cellulaires, qu'elles soient dues au cycle naturel ou bien à un état tumoral de la cellule infectée, des mécanismes de réplication et ségrégation sont mis en place pour empêcher la perte du génome viral au cours du temps. Dans le cas des herpesvirus décrits ici, l'établissement de la latence virale s'accompagne soit d'une intégration soit de la circularisation et de la chromatinisation du génome viral dans le noyau cellulaire, ces deux situations limitant l'expression des gènes viraux.

1. Latence dans des cellules quiescentes strictes

L'infection de cellules du système nerveux, notamment des neurones, présente un double avantage : un environnement immunitaire particulier et un état de quiescence des cellules. Les herpesvirus humains appartenant à la sous famille des α-herpesvirinae (HSV1 et 2, VZV) sont des prototypes de virus latents infectant les neurones. Dans le cas du virus HSV1, les virions infectent les neurones sensitifs sous-jacents à l'épithélium cutané, site d'une intense

réplication virale, et suivent ensuite un transport rétrograde jusqu'au corps cellulaire. Le génome viral est libéré dans le noyau et persiste sous forme épisomique. L'absence de la protéine de tégument VP16, décrite comme un inducteur du cycle productif, promeut la mise en place de cet état latent plutôt que l'induction du cycle productif. L'état latent est maintenu par (i) l'expression des transcrits de latence, les ARN LAT (*Latency Associated Transcript*) capables d'inhiber l'expression des gènes clés du cycle productif (ICP0, ICP4 et ICP34.5) et (ii) la présence de marqueurs répresseurs de la chromatine comme H3K9me2/3 et H3K27me3, au niveau de ces mêmes gènes (pour une revue voir Wilson et Mohr 2012). L'absence de division cellulaire permet au virus de persister, invisible du système immunitaire, tant que le cycle productif n'est pas induit.

2. Latence dans des cellules en prolifération

Deux stratégies de latence dans des cellules en prolifération ont été décrites : la première consiste en l'intégration du génome viral au sein de l'ADN de l'hôte (Virus de la Maladie de Marek - MDV, HHV6) ; la seconde consiste en une réplication et une ségrégation du génome viral concomitante à celle du génome cellulaire (EBV, KSHV).

a. Intégration du génome viral

Le virus de la maladie de Marek, appartenant à la sous-famille des *α-herpesvirinae*, est associé à un lymphome T chez le poulet. Les cellules tumorales, majoritairement monoclonales, se caractérisent notamment par l'intégration du génome viral au sein du génome cellulaire (Delecluse et Hammerschmidt 1993). Des séquences répétées télomériques présentes sur le génome viral sont impliquées dans l'intégration fréquente de l'ADN viral au niveau des régions télomériques des chromosomes cellulaires (Kaufer, Jarosinski, et Osterrieder 2011). De manière similaire, HHV6, un *β-herpesvirinae* humain, s'intègre au niveau des télomères de la cellule hôte. Cependant, l'efficacité d'intégration est bien moindre comparée à celle du MDV. En effet, la prévalence du virus HHV6 au sein de la population est estimée à virtuellement 100 %, mais une forme intégrée n'est retrouvée que dans 0,2 % à 1 % de la population (Gravel, Sinnett, et Flamand 2013). Il a notamment été démontré une intégration au sein de cellules germinales permettant une transmission verticale du génome viral (Kaufer et Flamand 2014). En absence d'intégration, l'infection de cellules quiescentes par HHV6 conduit à la production de particules virales à bas bruit permettant une persistance virale (Flamand *et al.* 2010).

L'intégration du génome viral dans les chromosomes cellulaires permet un maintien dans des cellules en prolifération avec un rendement maximum, indépendamment de facteurs viraux.

b. Maintien indépendant de l'intégration dans des cellules en prolifération

Le virus de la maladie de Borna (BDV), de la famille des *Bornaviridae*, établit une infection persistante dans le système nerveux, au sein de neurones notamment. Son maintien repose sur une réplication à bas bruit sans effet cytopathique pour la cellule hôte. L'une des caractéristiques intéressantes du BDV provient de la capacité du génome à ARN du virus à interagir avec la chromatine cellulaire afin d'être ségréger efficacement lors de la mitose (Matsumoto *et al.* 2012). Cet ancrage se fait par l'interaction entre la protéine de nucléocapside virale et la protéine cellulaire HMGB1, facteur interagissant avec la chromatine. Ainsi le génome viral serait capable de se maintenir dans des neurones en division, sans production de particule virale, notamment lors de l'infection précoce de l'hôte au stade embryonnaire.

Ce mécanisme d'ancrage du génome viral au génome cellulaire lors de la mitose est également retrouvé chez les *γ-herpesvirinae* humains : EBV et KSHV (le maintien d'EBV est décrit plus précisément par la suite). L'infection des lymphocytes B conduit à la mise en place d'une latence, à savoir l'établissement de l'épisome viral sous forme de chromatine dans le noyau. Lors de la division des cellules infectées, la réplication de l'épisome en phase S et l'ancrage de ce même épisome à la chromatine cellulaire en mitose permet le maintien du génome viral. Ce mécanisme de maintien permet une persistance virale sans production de particule virale et est assuré par les protéines orthologues EBNA1 (pour EBV) et LANA (pour KSHV ; Domsic *et al.* 2013).

HCMV, un *β-herpesvirinae* humain, établit une latence au sein des cellules de la lignée myéloïde $CD34^+$ et $CD14^+$. Les monocytes $CD14^+$ ne se divisent pas et le génome viral est maintenu sous forme épisomique de la même manière que pour les virus herpes de type 1 et 2 (Goodrum, Caviness, et Zagallo 2012). Cependant, les cellules progénitrices de la lignée myéloïde (HPC) $CD34^+$ prolifèrent. Le maintien du génome viral dans ces cellules a été décrit en 2014 par Tarrant-Elorza *et al.* (Tarrant-Elorza, Rossetto, et Pari 2014). Ces travaux ont permis l'identification d'une protéine produite à partir de l'exon 4 issu de l'ARN de la protéine immédiate précoce IE1, exprimé uniquement dans les cellules $CD34^+$. Le produit de la traduction de cet exon est une protéine d'environ 60 kDa nommé IEx4. Ces travaux démontrent le rôle clé d'IEx4 dans le maintien du génome viral dans des cellules en prolifération. IEx4 interagit directement avec les régions TR du génome viral, mais également avec les régions centromériques des chromosomes cellulaires. Les mécanismes de réplication et ségrégation n'ont pas été complètement élucidés, mais il est vraisemblable qu'ils soient similaires à ceux de KSHV et EBV.

Des systèmes similaires ont été décrits pour d'autres familles virales : les virus de la famille des *Papillomaviridae* (HPV notamment) codent pour les protéines E1 et E2, responsables de la réplication de l'épisome (E1 et E2) et de son ancrage à la chromatine

mitotique (E2 seulement, You 2010). L'ancrage de l'épisome viral aux chromosomes mitotiques a notamment été décrit comme étant dépendant de la protéine Brd4. Brd4 est une protéine de la famille des BET (*Bromodomaine and Extra Terminal domain*) impliquée dans de nombreux processus comme la croissance cellulaire et la régulation de la transcription (Zheng *et al.* 2009). Le virus Simien 40 (SV40) exprime l'antigène T impliqué dans la réplication du génome viral. Cependant aucun mécanisme d'interaction avec la chromatine mitotique n'a encore été décrit. Le maintien de l'épisome au cours du temps reposerait sur une réplication importante du génome viral permettant de pallier sa dilution aux cours des cycles cellulaires (Fahrbach, Katzman, et Rundell 2008).

II. Maintien du virus d'Epstein-Barr

Comme décrit précédemment, l'établissement de la latence virale au sein des cellules B mémoires résulte d'un processus complexe très proche du modèle de maturation des cellules B mémoires naturelles. Lors de la mise en place du centre germinatif, une phase d'hyperprolifération du lymphocyte B infecté a lieu. Un mécanisme de maintien de l'épisome dans ces cellules en prolifération est nécessaire. Ce même mécanisme est également requis dans le contexte d'une prolifération de cellules tumorales. La protéine EBNA1 et la région *oriP* sont les deux facteurs viraux nécessaires et suffisants au maintien de l'épisome viral au cours des divisions cellulaires (J. Yates *et al.* 1984 ; J. L. Yates, Warren, et Sugden 1985). La protéine EBNA1 possède la capacité d'interagir avec l'*oriP* sur des séquences spécifiques, mais également avec les chromosomes cellulaires. D'un point de vue dynamique, l'épisome viral se comporte de la même façon qu'un chromosome cellulaire en n'effectuant qu'une réplication par cycle (J. L. Yates et Guan 1991). En mitose, le génome viral ségrège dans chaque cellule fille en interagissant indirectement avec les chromosomes mitotiques (**figure 10**). Le rôle essentiel de la protéine EBNA1 dans le maintien du génome viral a été démontré en 2003. Des virions, dont le génome encapsidé est amputé du gène codant pour EBNA1, ont été produits dans le but d'étudier leurs capacités d'immortalisation de lymphocytes B primaires en LCL (Humme *et al.* 2003). Le virus mutant ΔEBNA1 a un taux d'immortalisation 10 000 fois inférieur au virus sauvage. De plus, dans l'ensemble des lignées LCL ainsi établies, le génome viral est retrouvé intégré et non épisomique comme pour le sauvage.

1. Structure de l'*oriP*

La région *oriP* sur le génome viral se compose de deux domaines séparés par une séquence de 1 kb : le premier domaine, *Family of Repeats* (FR) est impliqué dans la ségrégation de l'épisome ; le second domaine, *Dyad Symmetry* (DS) est impliqué dans la réplication (**figure 11-A** ; Rawlins *et al.* 1985 ; Ambinder *et al.* 1990 ; Harrison, Fisenne, et Hearing 1994 ; Middleton et Sugden 1994). Le domaine FR se compose de 20 répétitions de

30 pb contenant chacune un motif d'interaction pour EBNA1 de 16 pb. Le domaine DS se compose de 4 motifs d'interaction pour EBNA1 de plus faible affinité fonctionnant en tandem. La structure de ce tandem est cruciale pour la réplication. En effet, l'espacement entre le centre des sites d'interaction pour EBNA1 au sein d'un tandem doit être exactement de 21 nucléotides, l'ajout ou le retrait d'un seul nucléotide rendant le domaine DS incompétent pour la réplication du génome viral. Adjacent aux motifs d'interactions pour EBNA1 sur DS se trouvent 3 répétitions de 9 pb, identiques aux régions télomériques et interagissant directement avec les protéines TRF1 et TRF2 (Telomeric Repeat Factor). La composition en histones de l'*oriP* n'est pas clairement établie. L'évaluation de la présence d'histones au niveau de l'*oriP* a été faite par une méthode de reconstitution de nucléosomes en utilisant la séquence de l'*oriP*. Une première étude datant de 1989 (Sexton et Pagano 1989) montre la présence de nucléosomes sur FR mais pas sur DS, tandis qu'une étude plus récente montre la formation d'un nucléosome contenant le domaine DS *in vitro* (Avolio-Hunter, Lewis, et Frappier 2001). Cette deuxième étude démontre également que le domaine C-terminal d'EBNA1, interagissant avec DS, déstabilise l'octamère d'histones. Aucune étude n'a évalué la composition en histone de ces domaines *in cellulo*. Il est probable que la composition en histones varie au cours du cycle en fonction de la présence d'EBNA1, notamment durant la réplication, étape pendant laquelle les nucléosomes sont désassemblés au passage de la fourche de réplication (Kohn *et al.* 2008).

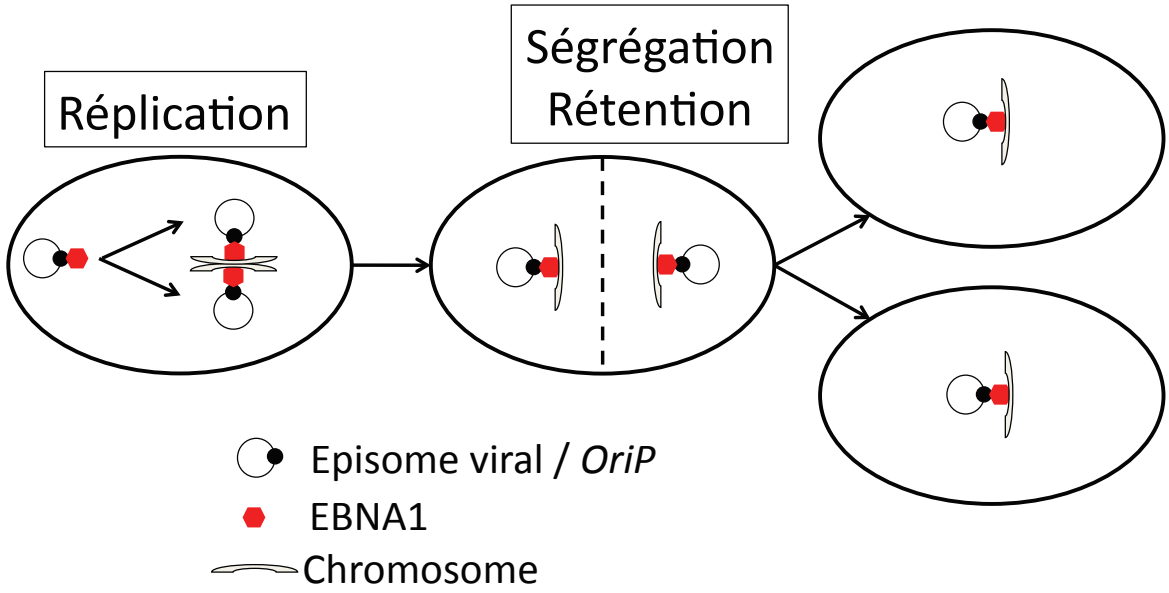


Figure 10 : Schéma du maintien du génome viral

En phase S, l'épisome viral est répliqué par la machinerie cellulaire qui est recrutée sur l'*oriP* par la protéine EBNA1. En plus d'être impliqué dans la réplication, l'ancrage du génome viral par la protéine EBNA1 sur la chromatine est crucial pour la ségrégation efficace des épisomes en mitose.

2. Structure de la protéine EBNA1

La protéine EBNA1, longue de 641 acides aminés (souche prototype B95.8 – accession number : P03211.1), est structurée en de nombreux domaines impliqués dans divers mécanismes (**figure 11-B**). La région N-terminale se compose de 2 domaines basiques encadrant une séquence riche en répétitions glycine-alanine. La région C-terminale se compose d'une queue acide et d'un domaine à résidus hydrophobes portant les fonctions d'homodimérisation de la protéine ainsi que d'interaction avec le génome viral. Entre ces deux régions, N- et C terminales, se trouve une plus petite région majoritairement basique dans laquelle se trouve notamment le NLS (*Nuclear Localization Sequence*). La structure crystalographique d'EBNA1 n'a pas encore été résolue dans son intégralité : seule celle du domaine carboxy-terminal a été résolue (**figure 12** ; Bochkarev *et al.* 1996). Cependant Hussain *et al.* ont publié récemment des structures prédictives de la protéine entière, à la fois sous forme monomérique mais également dimérique (**figure 13** ; Hussain, Gatherer, et Wilson 2014).

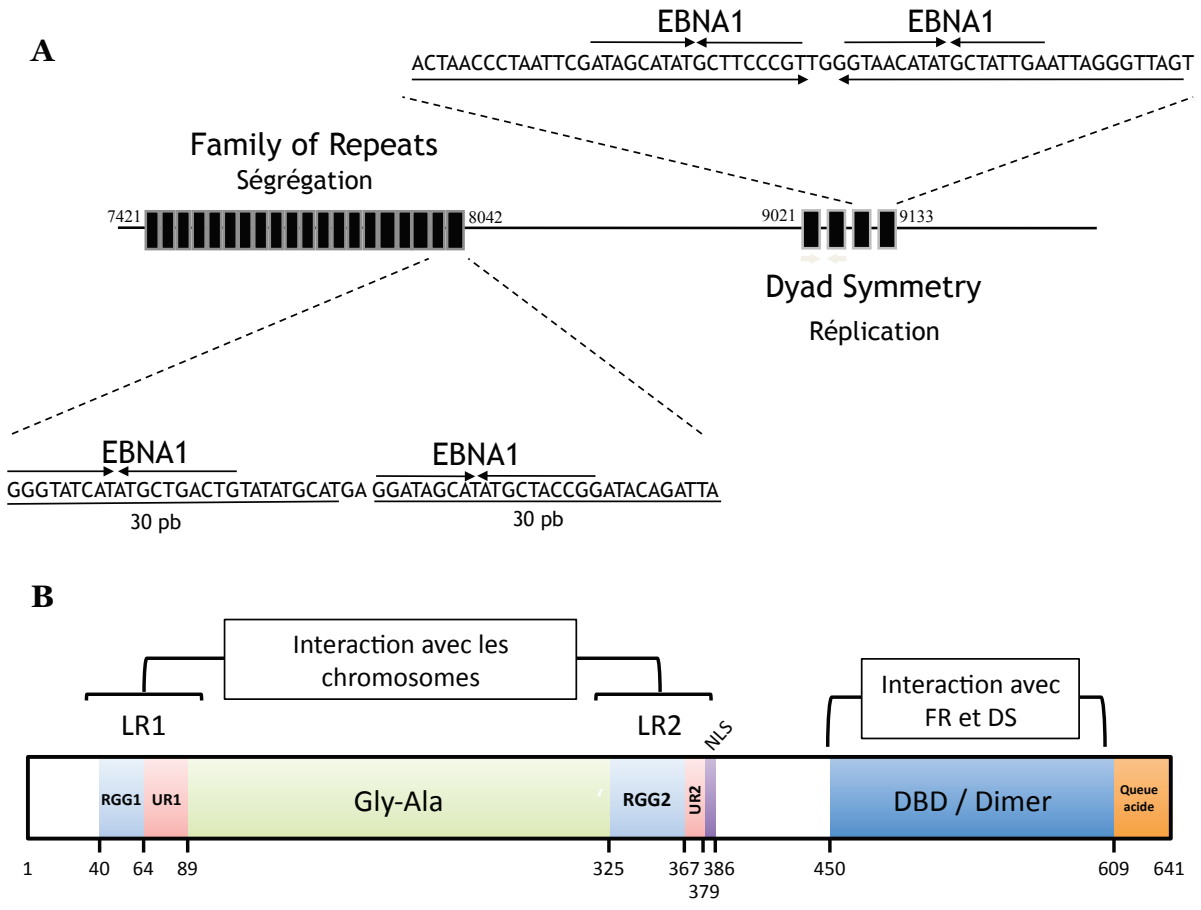


Figure 11 : Représentation schématique de la structure de l'*oriP* (A) et de la protéine EBNA1 (B)

L'ARN codant pour la protéine EBNA1 possède dans sa région non traduite en 5', plus précisément sur l'exon U, un IRES (*Internal Ribosome Entry Site* ; Å. Isaksson, Berggren, et Ricksten 2003). Le rôle exact de cet IRES n'a pas été identifié. Il est vraisemblable qu'il participe à la régulation de l'expression de la protéine EBNA1. En effet, une étude démontre l'existence d'un transcrit alternatif, présent dans le sang de patients post-transplantés, dans lequel l'exon U est epissé. Cette étude démontre également que l'expression de la protéine EBNA1 est diminuée dans le cas de l'isoforme sans IRES (Berggren *et al.* 2005). Deux autres études qui se sont intéressées au polymorphisme de cet IRES démontrent la présence d'un polymorphisme en position 67 585 du transcrit (T vers C ; A. Isaksson *et al.* 2007 ; Endo *et al.* 2004). Les travaux de Endo *et al.* montrent que ce polymorphisme est présent chez des patients atteints d'infection chronique par EBV ou de manière exclusive dans les LCLs (15 lignées de LCL testées). Cependant, pour des patients présentant une MNI, il n'est présent que dans 1 cas sur 19. Ainsi le polymorphisme 67 585C serait associé à un établissement de latence à long terme, à l'inverse du polymorphisme 67 585T.

a. La région Glycine-Alanine

La région glycine-alanine (aa 89 à 325 ; Gly-Ala) est impliquée principalement dans l'échappement au système immunitaire. En effet, malgré la présence de lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre la protéine EBNA1 présents dans l'organisme, les cellules infectées par EBV présentant un profil de latence I (n'exprimant que la protéine EBNA1) ne sont pas reconnues et persistent dans l'organisme (Blake *et al.* 1997). Les premiers éléments de réponse concernant ce mécanisme d'échappement ont été apportés au cours des années 2000, notamment par Yin *et al.* (Yin, Manoury, et Fåhraeus 2003). Cette incapacité de reconnaissance est liée à une inhibition de la présentation de la protéine EBNA1 par le CMH-I. Cette inhibition est portée par la région glycine-alanine qui limite l'expression de la protéine en inhibant les étapes précoces de la traduction mais également en inhibant la dégradation de la protéine par le protéasome (Levitskaya *et al.* 1997). En 2008 et 2012 les travaux de Judy Tellam *et al.* (J. Tellam *et al.* 2008 ; J. T. Tellam *et al.* 2012) suggèrent que l'inhibition de la traduction provient non pas de la séquence en acides aminés mais de la séquence nucléotidique et plus particulièrement d'un biais dans sa composition en purine. *A contrario*, les travaux d'Apcher *et al.* suggèrent (Apcher *et al.* 2009) que cette inhibition est dépendante de la séquence en acides aminés et non pas de la séquence de l'ARN. Les travaux d'Apcher *et al.* suggèrent également une régulation par la région Gly-Ala de la protéine pour l'assemblage des ribosomes sur l'ARNm d'EBNA1. Cette hypothèse est étayée par l'utilisation d'un IRES placé en amont de la région Gly-Ala. Des expériences *in vitro* montrent que l'IRES c-Myc permet l'expression d'une construction contenant la séquence du gène de l'ovalbumine et de la séquence Gly-Ala de même intensité qu'une construction sans la séquence Gly-Ala

(Apcher *et al.* 2010). Il est ainsi possible de spéculer que la région Gly-Ala interagit avec un facteur impliqué dans l'initiation de la traduction, facteur absent dans le cas d'une initiation par un IRES.

Plus de 90 % des épitopes immunogènes d'EBNA1 ont été identifiés en aval de la région glycine-alanine, ainsi un arrêt précoce de la traduction limiterait le nombre de ces épitopes issus de la dégradation de la protéine, mais aussi la génération d'épitopes issus de produits ribosomaux défectifs (Defective Ribosomal Product – DRiP ; J. Tellam *et al.* 2007).

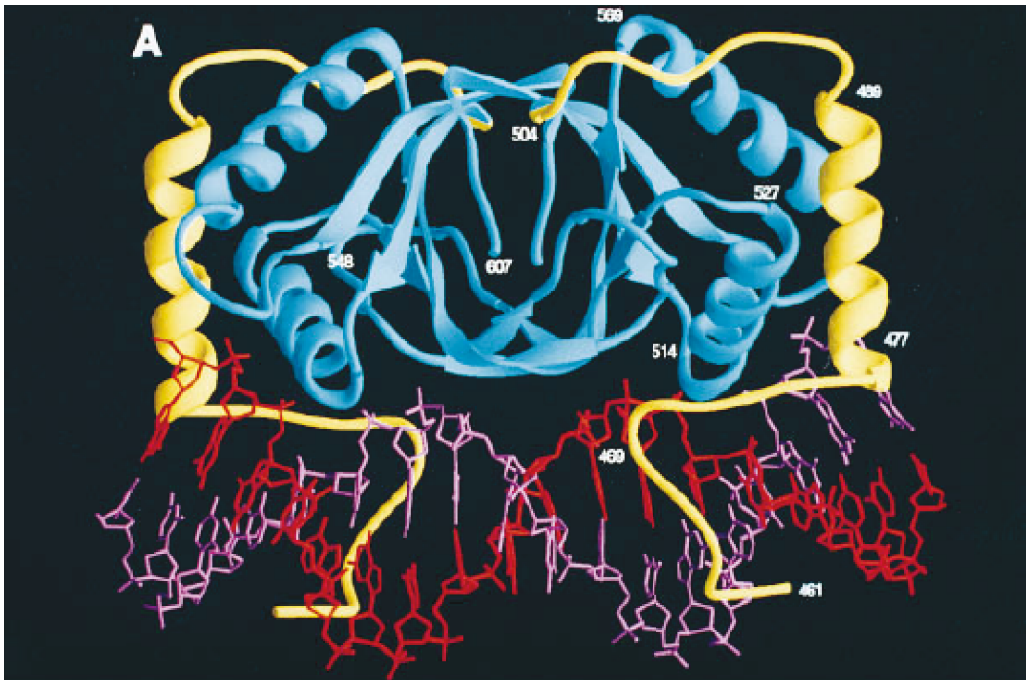


Figure 12 : Interaction du domaine C-terminal d'EBNA1 sous forme d'homodimère avec l'ADN (d'après Bochkarev *et al.* 1996)

Le domaine de dimérisation (aa 504 à 607) est représenté en bleu, les régions flanquantes impliquées dans l'interaction avec l'ADN sont représentées en jaune (aa 461-503). La position des acides aminés notés correspond à leurs positions issus de la protéine EBNA1 de la souche virale B95.8.

b. DNA Binding Domain (DBD) et domaine d'homodimérisation

La majeure partie de la région Carboxy-terminale est occupée par les domaines de dimérisation et d'interaction avec l'ADN (aa 450 à 609) de la protéine. Ce domaine interagit avec l'ADN de manière séquence spécifique, notamment avec FR pour lequel EBNA1 a le plus d'affinité, suivi de DS et enfin du promoteur Qp. La structure crystallographique de la région carboxy-terminale d'EBNA1, sous forme dimérique, en interaction avec l'ADN a été résolue par Bochkarev *et al.* (Bochkarev *et al.* 1996) : le domaine de dimérisation est localisé entre les résidus 504 et 607 (**figure 12**). Ce domaine forme un tonneau de 2 fois 4 feuillets ß entourés de 2 hélices α et est suffisant pour interagir avec l'ADN. Cependant, en amont de ce domaine se trouve un domaine flanquant augmentant l'affinité d'EBNA1 pour l'ADN. Ce domaine est composé d'un bras peptidique (aa 461-479) s'intercalant dans le petit sillon de l'ADN et d'une

hélice α (aa 477-489) perpendiculaire à l'ADN. Summers *et al.* démontrent que l'affinité d'EBNA1 pour les différents sites de DS n'est pas la même : l'affinité pour le site 1 est supérieure à celle du site 2 (Summers *et al.* 1996). Cependant, l'affinité du dimère d'EBNA1 pour le site 2 augmente lorsque celui-ci est placé en aval du site 1. Ces données démontrent un assemblage coopératif entre les dimères d'EBNA1 sur le domaine DS et suggèrent un phénomène similaire sur FR. L'extrémité C-terminale (aa 609-641) a été décrite comme un domaine hautement acide, cependant son rôle n'est pas encore élucidé.

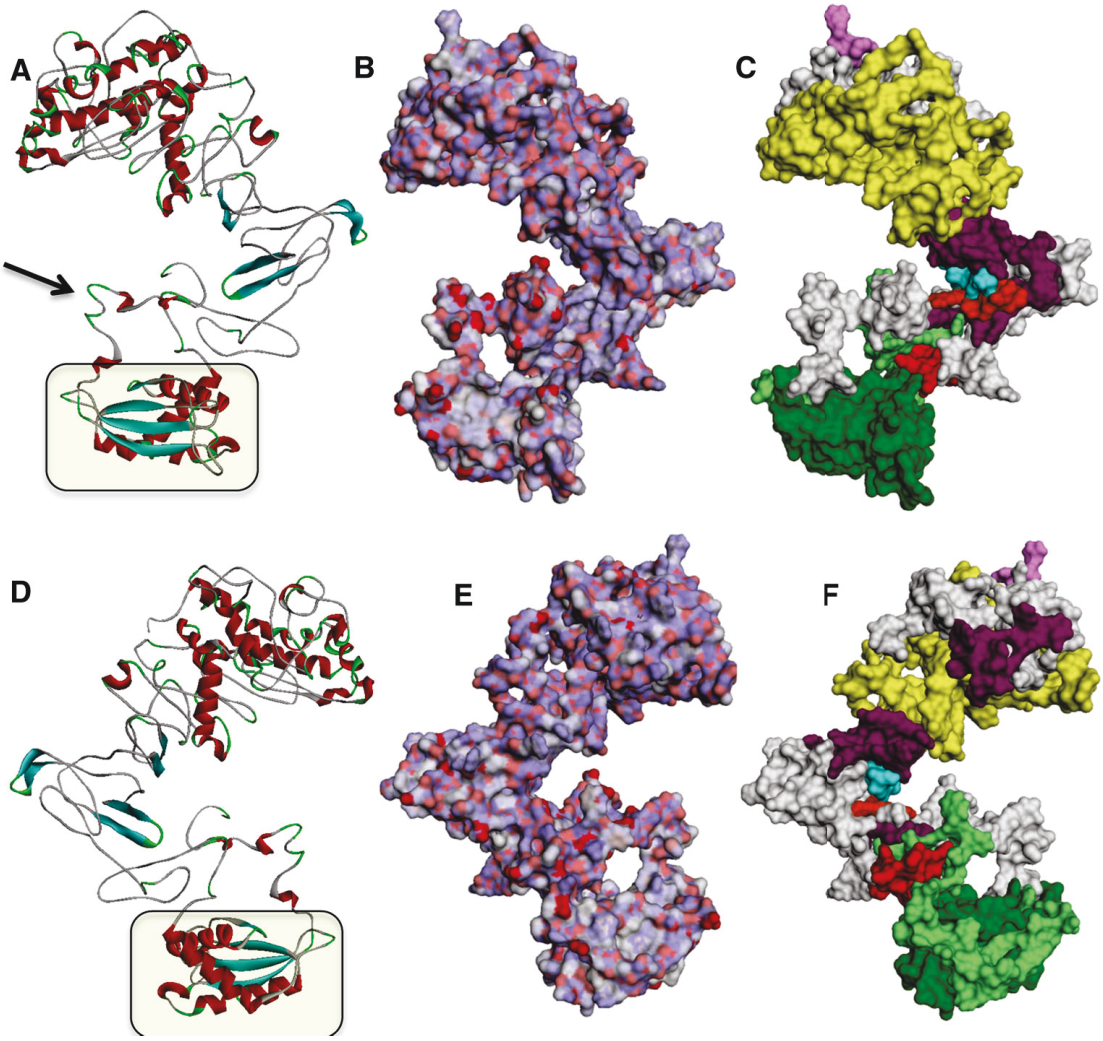


Figure 13 : Structure prédictive de la protéine EBNA1 entière sous forme monomérique (d'après Hussain *et al.* 2014)

Structure de la protéine EBNA1, issue de la souche B95.8, en utilisant I-TASSER, MOE et Modeller (A, B et C) et après une rotation à 180° (D, E et F). Le carré (sur A et D) représente la région résolu par cristallographie. B et E : diagramme electrostatique de surface. C et F : Topologie de surface avec les domaines d'interaction identifiés représentés en couleur (jaune : Gly-Ala ; violet : LR1 et LR2 ; cyan : domaine d'interaction pour CK2 ; orange : NLS ; rouge : domaine d'interaction pour USP7 ; vert : DBD et domaine de dimérisation).

c. *Les domaines LR1 et LR2 (Linking Region 1 / 2)*

De part et d'autre de la région glycine alanine se trouvent les domaines LR1 (aa 40 à 89) et LR2 (aa 325 à 379) impliqués dans l'interaction de la protéine EBNA1 avec la chromatine, notamment mitotique. Laine *et al.* démontrent que des peptides dérivés de la région LR2 (aa 320 à 355 et 351 à 377) sont capables d'induire des boucles sur une molécule d'ADN (Laine et Frappier 1995). Cependant, cette observation n'a jamais été confirmée dans le cadre de la protéine entière. La délétion du domaine LR2 entraine la perte de l'épisome viral sans que la réplication ne soit affectée.

Les domaines LR1 et LR2 possèdent chacun une région riche en arginine et glycine (RGG-rich), et une région unique (UR1 et UR2). La région RGG-rich est une région de type crochet à AT (AT-hook) similaire à celle trouvée dans la protéine HMGA1a. Cette région est capable d'interagir avec des séquences riches en AT *in vitro* (Sears *et al.* 2004). Les régions UR et RGG quant à elles sont impliquées dans les mécanismes de transactivation de promoteurs viraux mais aussi cellulaires nécessaires à l'immortalisation (Singh *et al.* 2009). Ces domaines seraient également impliqués dans le recrutement du complexe ORC (*Origin Recognition Complex*) sur DS lors de la réplication de l'épisome viral (Norseen *et al.* 2008).

d. *Import nucléaire de la protéine EBNA1*

L'import de la protéine EBNA1 dans le noyau est sous contrôle d'un NLS situé entre les acides aminés 379 à 386. Ce mécanisme d'import implique l'interaction avec la protéine NPI—1 (nommé également importine α5 - Ito *et al.* 2000). Les acides aminés 379, 380 et 383 sont essentiels pour l'import de la protéine EBNA1 (Kitamura *et al.* 2006). Enfin, la phosphorylation de la sérine 385 augmente l'affinité entre EBNA1 et NPI-1 ce qui permettrait notamment un import nucléaire plus rapide.

e. *Polymorphisme de la protéine EBNA1*

Le polymorphisme de la protéine EBNA1 a été observé au niveau de deux régions : la région glycine-alanine et une région située dans la partie carboxy-terminale. Le polymorphisme de la région glycine-alanine a été décrit en 1985. L'étude a porté sur la longueur de cette région. La plus courte forme de la protéine EBNA1 identifiée est de 69 kDa contre 94 kDa pour la plus longue et l'isoforme la plus fréquente fait 79 kDa (Allday et MacGillivray 1985). En 1997, Gutiérrez *et al.* identifient un polymorphisme situé entre les acides aminés 469 à 530 définissant 5 sous-types : P-ala, P-thr, V-pro, V-leu et V-val (P signifiant prototype, V signifiant variant : nom basé sur l'acide aminé en position 487 ; Gutiérrez *et al.* 1997). De manière intéressante, le sous-type V-val est absent des lymphocytes B mais retrouvé dans la salive et au sein de NPC (Snudden *et al.* 1995 ; W.-Y. Wang *et al.* 2002). Le variant V-val aurait la capacité de promouvoir la survie d'une culture de cellule

HEK-293 en absence de sérum (Chao *et al.* 2014) et aurait une activité transcriptionnelle meilleure que P-ala (Zeng 2010), lui conférant un pouvoir oncogène particulier pouvant expliquer sa prévalence au sein des NPC.

3. Rôle d'EBNA1 dans la réplication du génome viral pendant la latence

A l'inverse du cycle productif durant lequel EBV exprime une ADN polymérase virale impliquée dans la réplication du génome viral, en phase latente aucune protéine virale exprimée ne possède d'activité polymérase. La protéine EBNA1 recrute la machinerie de réplication cellulaire sur le domaine DS ce qui permet la réplication du génome viral en phase S (Gahn et Schildkraut 1989).

Les premiers travaux explorant les mécanismes de la réplication du génome viral ont été publiés en 2001 par Dhar *et al.* et Schepers *et al* (Dhar *et al.* 2001 ; Schepers *et al.* 2001). Ces travaux démontrent l'implication de la machinerie de réplication cellulaire dans la réplication de l'épisome, notamment du complexe ORC et de la protéine Cdt1. Par la suite les travaux de Ritzi *et al.* (Ritzi *et al.* 2003) appuyèrent ces résultats en démontrant une dynamique de recrutement des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN similaire au niveau des origines de réplication cellulaire et de l'*oriP* (au niveau de DS). Brièvement, durant la phase G1, la protéine EBNA1 recrute sur l'*oriP* les facteurs Orc3 et 6 dont le recrutement est facilité par la présence de la protéine Cdc6 (Moriyama *et al.* 2012). Ces facteurs permettent le recrutement du complexe MCM (*Minichromosome Maintenance Complex*) et de la protéine Cdt1, ce qui au final formera le complexe de pré-réplication (pre-RC). L'entrée en phase S se caractérise par l'activation du complexe S-CDK (CDK2-cyclin A) et de la protéine Cdc7 notamment. Ces deux facteurs activent les fourches de réplication et déstabilisent le pre-RC pour empêcher la formation d'une seconde fourche de réplication au même endroit. L'étude de la réplication *per se* de l'épisome n'a pas été effectuée, mais compte tenu de la présence des complexes MCM2 et 7 ainsi que de l'ORC, il est vraisemblable que les mécanismes de réplication virale soient identiques aux mécanismes cellulaires et qu'un épisome ne se réplique qu'une seule fois par cycle (**figure 14**).

Entre les années 2008 et 2010, l'équipe de P.M. Lieberman a publié de nombreux travaux sur la régulation de la réplication de l'épisome par *oriP*. Elle a démontré que la réplication de l'épisome viral se déroulait durant les étapes tardives de la phase S et que ce délai était dépendant de la protéine TRF2 (Zhou, Snyder, et Lieberman 2009). D'autres travaux de cette équipe ont démontré le rôle des protéines PARP1 dans la régulation de l'interaction EBNA1/DS et Chk2 dans le remodelage de la chromatine au niveau de l'*oriP* (Tempera *et al.* 2010 ; Zhou *et al.* 2010). Le recrutement du complexe ORC par la protéine EBNA1 est actuellement un sujet controversé. Les régions LR1 et LR2, notamment les

domaines AT-Hooks, ont été décrites comme nécessaires au recrutement du complexe ORC. Ce recrutement nécessiterait la présence d'un ARN non spécifique, avec une affinité supérieure pour des ARN riches en G formant des quadruplex-G par rapport à un ARN non structuré (Norseen *et al.* 2008 ; Norseen, Johnson, et Lieberman 2009). L'utilisation d'une drogue spécifique des structures en quadruplex-G, Braco 19, inhibe la réplication de l'épisome dépendante de l'*oriP*. De plus, le traitement de lignées cellulaires EBV positives par cette drogue induit une diminution du nombre d'épisomes par cellule. Cependant deux études publiées en 2012 et 2013 nuancent ce modèle. Moriyama *et al.* démontrent une interaction directe entre la protéine Cdc6 et la protéine EBNA1. La présence de la protéine Cdc6 permettrait le recrutement du complexe ORC sur l'*oriP* indépendamment de l'ARN (Moriyama *et al.* 2012). Par ailleurs Hodin *et al.* démontrent que les régions LR1 et LR2 d'EBNA1 (aa 16 à 376) peuvent être substituées par un domaine hétérologue gardant la capacité d'interaction avec la chromatine cellulaire (séquence d'interaction avec les nucléosomes de LANA ou de l'IL-33), mais ne possédant pas de domaine spécifique de type AT-Hook, sans altérer ses fonctions notamment lors de la réplication (Hodin, Najrana, and Yates 2013). De plus, ces travaux démontrent qu'un plasmide ne comportant que la région DS a un taux de réplication de seulement 2,5 % comparé a un plasmide portant un *oriP* complet (FR + DS) dans le contexte de la lignée cellulaire Raji, résultat similaire à celui d'une étude parue en 1989 (Wysokenski and Yates 1989). Ces travaux suggèrent donc que l'ancrage de l'épisome viral aux chromosomes cellulaires est un facteur clé pour une réplication efficace : la nécessité de la région FR pourrait rendre compte de cet ancrage. À la lumière de ces résultats, les mécanismes d'interactions entre EBNA1, ancrée à l'*oriP*, et la chromatine semblent complexes et font appel à de nombreux systèmes, sans qu'un système n'en exclue un autre.

Enfin l'interaction d'EBNA1 avec la région FR a été décrite comme pouvant bloquer les fourches de réplication et de transcription. Ce blocage permettrait d'éviter la collision de ces fourches, collision pouvant être à l'origine de cassures double brin de l'ADN (Aiyar *et al.* 2009).

Un élément de réplication alternatif, Rep*, a été identifié en 1998 à proximité de l'*oriP* (Kirchmaier and Sugden 1998). Ce domaine comporte 2 sites d'interaction pour la protéine EBNA1 avec un espace de 21 nucléotides, identique à celui trouvé dans l'élément DS, critique pour la réplication. Les mécanismes de réplication au niveau de Rep* sont les mêmes que pour DS avec une moins bonne efficacité, efficacité qui peut-être augmentée en incorporant 8 répétitions de la séquence Rep* (J. Wang *et al.* 2006). Cependant la réplication par Rep* n'est pas le mécanisme majoritaire dans un contexte où l'*oriP* est présent. L'homologie de séquence et de structure avec DS laisse supposer un événement de duplication à l'origine de Rep* ou inversement Rep* pourrait représenter une forme ancestrale de DS.

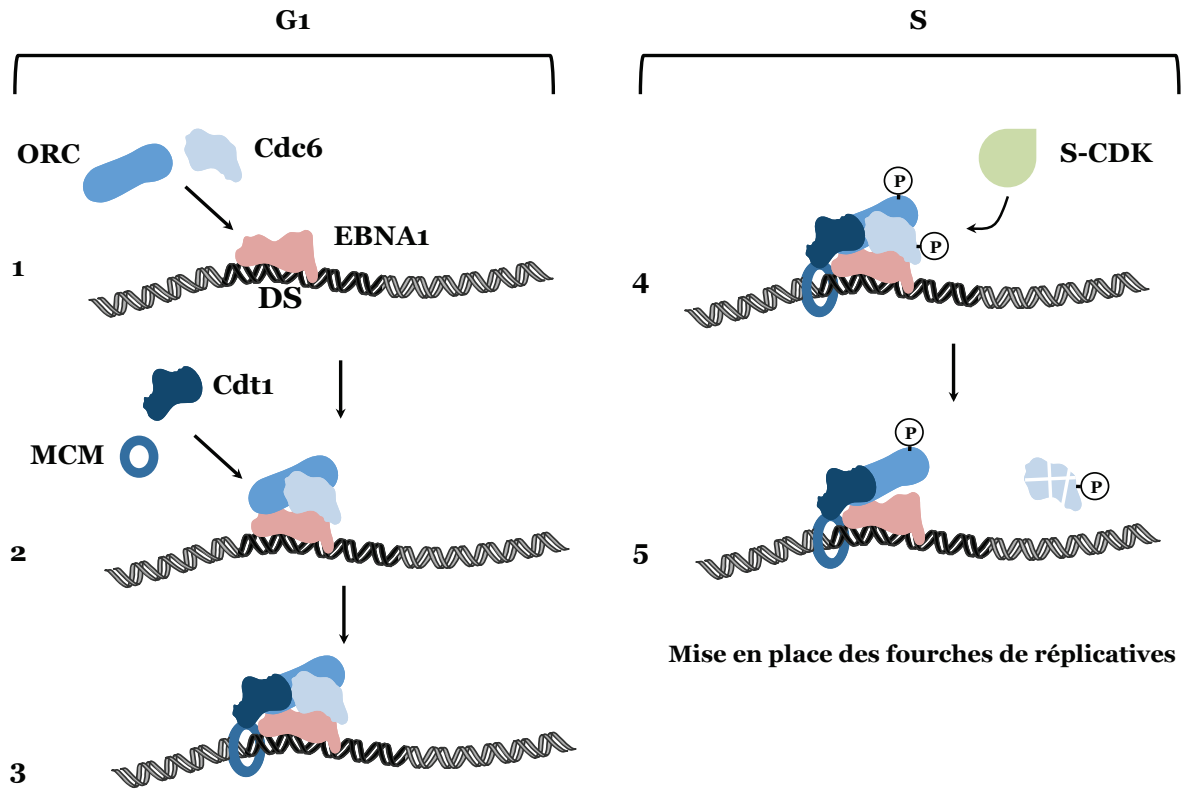


Figure 14 : Étapes précoces de la réplication du génome viral

Le complexe de pré-réplication se mets en place sur l'OriP durant la phase G1 (aussi appelé étape de « *Licensing* »). (1)EBNA1 recrute sur l'OriP les protéines ORC et cdc6 ce qui permet (2) le recrutement de MCM et cdt1. L'ensemble de ces protéines forment le complexe de pré-réplication (3). A l'entrée en phase S (4) le complexe S-CDK phosphoryle les protéines Cdc6 et ORC. (5) La phosphorylation de Cdc6 induit sa dégradation, empêchant la mise en place d'un nouveau complexe de pré-réplication. La phosphorylation d'ORC déclenche la réplication de l'ADN.

4. Dynamique et efficacité de maintien de l'épisome viral au cours du cycle cellulaire

Il est clairement établi que l'interaction entre la chromatine cellulaire et l'épisome viral est dépendante de l'interaction entre EBNA1 et cette même chromatine, l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* ne variant pas. Au cours du cycle cellulaire, l'affinité d'EBNA1 pour la chromatine cellulaire varie : la proportion de protéines EBNA1 interagissant avec la chromatine est forte en mitose, mais seule une fraction d'EBNA1 semble interagir stablement avec la chromatine en interphase (Ritzi *et al.* 2003). Étant donné que l'*oriP* est constamment en interaction avec EBNA1 et que l'ancrage de l'épisome à la chromatine est nécessaire à la réplication, il est vraisemblable que la fraction d'EBNA1 interagissant avec la chromatine soit également celle ancrée à l'*oriP*. Plusieurs études viennent appuyer cette hypothèse. Deutsch *et al.* (Deutsch *et al.* 2010) observent, en interphase, une répartition homogène de la protéine EBNA1 dans le noyau en absence du génome viral. À l'inverse, en présence de l'épisome,

EBNA1 a une localisation ponctiforme. Ils démontrent également que le génome viral se localise dans la région périchromatinienne du noyau et que cette localisation est dépendante de l'*oriP*. La périchromatine est une région transcriptionnellement active, cette localisation permettrait l'expression des gènes de latence, il n'est pas exclut qu'en latence 0 cette localisation change du fait du nombre très restreint de transcrits viraux et surtout de l'absence d'EBNA1. Kanda *et al.* ont étudié par une approche d'immuno-FISH le devenir des génomes viraux néo-synthétisés. En phase G2, ils observent un signal FISH correspondant au génome viral avec de part et d'autre la protéine EBNA1. De ce résultat, ils émettent l'hypothèse que lors de la réplication en phase S, l'épisome viral néo-synthétisé s'ancre à la chromatide sœur par la protéine EBNA1, donnant une structure en forme d'haltère observée par immuno-FISH (Kanda *et al.* 2007) ; la même année, Nanbo *et al.* ont évalué la répartition de plasmides dérivés de l'épisome viral contenant la protéine EBNA1 et l'*oriP*. Dans un premier temps, ces travaux confirment la co-localisation de 2 génomes viraux en phase G2. Dans un second temps, cette étude a permis de calculer un taux de ségrégation équitable (autant de plasmides dans chacune des cellules filles) de 88 % après la mitose (Nanbo, and Sugden 2007). La proximité des chromatides sœurs, maintenues ensemble par les cohésines, permettrait l'ancrage symétrique des épisomes nouvellement synthétisés et ainsi une ségrégation équitable (**figure 15**).

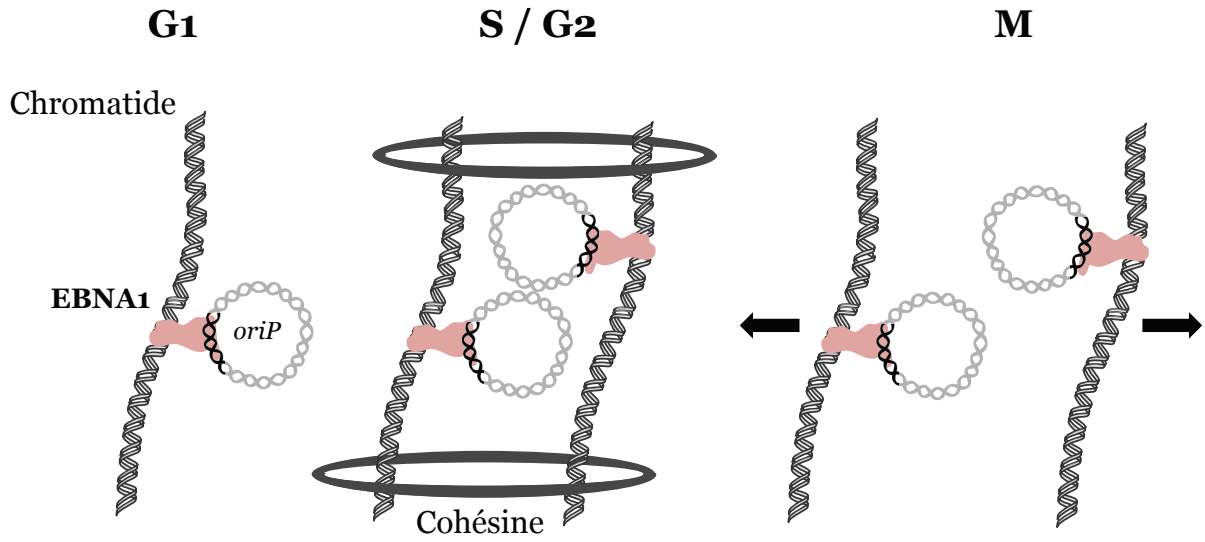


Figure 15 : Modèle pour la ségrégation des épisomes viraux pendant la mitose (d'après Nanbo *et al.* 2007)

Le complexe EBNA1-épisome interagirait avec la chromatine cellulaire tout a long du cycle cellulaire. En phase S, la réplication concomitante des chromatides et de l'épisome permettrait l'ancrage de l'épisome néo-synthétisé sur la chromatide sœur, le tout maintenu ensemble par les cohésines (structure donnant une forme d'haltère en immuno-FISH). La disruption des cohésines en mitose et l'ancrage des épisomes aux chromatides sœurs permet une ségrégation efficace dans les cellules filles.

En 2013, Coppotelli *et al.* ont analysé le rôle du domaine Gly-Ala dans la mobilité de la protéine (Coppotelli, Mughal, and Masucci 2013). Ils démontrent que plus le domaine est long plus la protéine est mobile dans le noyau. Ce résultat traduirait que la région Gly-Ala est impliquée dans la stabilité de l'interaction avec la chromatine. La longueur de la région Gly-Ala influence vraisemblablement la structure de la protéine. Cette modification de la structure est certainement à l'origine des différences de stabilité observées.

5. Ségrégation du génome viral lors de la mitose

A la suite de la mitose, les chromosomes cellulaires sont équitablement distribués avec une chromatide dans chaque cellules filles. De la même manière, le maintien du génome viral dépend de sa correcte ségrégation durant la mitose (**figure 16**).

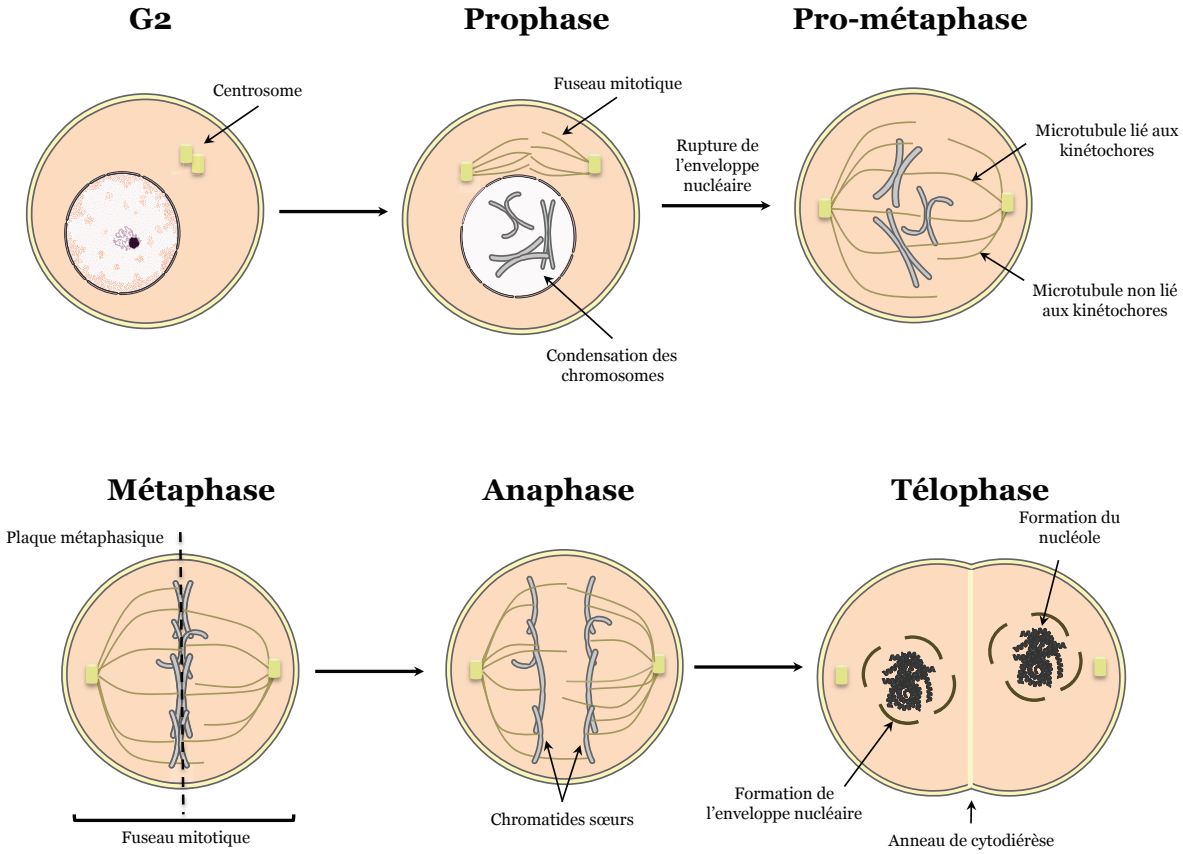


Figure 16 : Schéma des différentes étapes de la mitose

Il a été démontré que l'ancrage de l'épisome viral aux chromosomes mitotiques, notamment en métaphase, était une étape cruciale pour une ségrégation efficace (Sears *et al.* 2003). De nombreuses études ont été effectuées afin de comprendre les mécanismes responsables de cet ancrage. Tout d'abord, l'interaction des épisomes viraux avec les chromosomes cellulaires est dépendante de la protéine EBNA1. EBNA1 interagit avec FR, *via*

son domaine C-terminal, et les chromosomes cellulaires, *via* son domaine N-terminal. En 1999 Marechal *et al.* identifient 3 régions (comprises dans les domaines LR1 et LR2) impliquées dans l'interaction d'EBNA1 avec les chromosomes cellulaires (CBS1 : aa 72-84, CBS2 : aa 328-365 et CBS3 : aa 8-54 ; Marechal *et al.* 1999) qui ont depuis été confirmées par de nombreuses équipes (Kanda *et al.* 2013 ; Sears *et al.* 2003).

Alors que l'interaction du domaine C-terminal d'EBNA1 avec l'*oriP* est bien caractérisée, l'interaction des régions LR1 et LR2 avec la chromatine cellulaire reste encore mal définie. L'équipe de L. Frappier identifie la protéine cellulaire EBP2 (Epstein-Barr Binding Protein 2) comme partenaire de la protéine EBNA1 (Shire *et al.* 1999). Des travaux ultérieurs de cette équipe suggèrent que la protéine EBP2 est impliquée dans l'ancrage de la protéine EBNA1 aux chromosomes mitotiques (Priya Kapoor and Frappier 2003 ; Priya Kapoor, Lavoie, and Frappier 2005). Cependant une étude récente vient de démontrer que les protéines EBNA1 et EBP2 n'interagissent pas en mitose (Jourdan *et al.* 2012). Le rôle de la protéine EBP2 reste ainsi à préciser, notamment sur sa capacité, dans un modèle de levure, à maintenir un plasmide possédant le domaine FR en présence de la protéine EBNA1 (P. Kapoor 2001). L'étude de Jourdan *et al.* (Jourdan *et al.* 2012) a également porté sur le facteur chromatinien HMGB2, dont l'interaction avec EBNA1 a été initialement identifiée par crible deux-hybrides. Ils démontrent qu'EBNA1 et HMGB2 interagissent en interphase et en mitose. De plus, en absence d'HMGB2, la mobilité d'EBNA1 augmente aussi bien en interphase qu'en mitose. Cependant, EBNA1 est toujours localisée sur la chromatine mitotique même en absence d'HMGB2. Ce dernier résultat suggère que la fonction d'HMGB2 serait de stabiliser EBNA1 sur la chromatine cellulaire mais que d'autres mécanismes, comme d'autres facteurs cellulaires, ont la même capacité.

D'autres études ont été publiées accréditant une interaction directe de la protéine EBNA1 avec les chromosomes mitotiques. Tout d'abord il a été démontré que les domaines LR1 et LR2 possèdent des régions AT-hook susceptibles d'interagir avec des régions riches en AT. Cette propriété a notamment été démontrée *in vitro* (Sears *et al.* 2004), mais aucun variant d'EBNA1 muté pour ces régions n'a été testé permettant d'évaluer la contribution de ces régions dans la réplication, l'ancrage et le maintien du génome viral. Une étude récente analyse l'effet de la nétropsine, une molécule chimique capable d'interagir avec les régions AT et de bloquer l'interaction entre ces régions et des domaines AT-hook, sur le maintien de l'épisome viral (Chakravorty and Sugden 2015). Les auteurs montrent que le traitement par la nétropsine de la lignée SalI EBV$^+$ induit une diminution du nombre d'épisomes par cellule après 15 jours de traitement. Ils montrent aussi que le traitement des lignées cellulaires SalI, EBV positive ou non, induit une inhibition de croissance supérieure pour la lignée EBV positive vraisemblablement due à la perte de l'épisome. L'effet de la nétropsine sur le maintien du génome viral démontre un rôle des régions AT dans le maintien du génome viral.

Cependant, l'effet observé après 15 jours de traitement reste modéré, il est probable que les régions AT fassent partie d'un ensemble de mécanismes impliqué dans le maintien. Kanda *et al* ont démontré que l'interaction entre EBNA1 et la chromatine mitotique est dépendante de résidus arginines présents dans les régions LR1 et LR2 (Kanda *et al.* 2013). La substitution de ces arginines par des alanines inhibe l'ancrage d'EBNA1 aux chromosomes mitotiques et inhibe le maintien d'un plasmide dérivé de l'épisome viral. À l'inverse la substitution de ces arginines par des lysines n'affecte pas la localisation d'EBNA1, laissant supposer un rôle essentiel des charges positives de ces résidus dans l'interaction avec la chromatine. Ils démontrent également que des peptides dérivés de la région LR1 sont capables d'interagir directement avec des nucléosomes *in vitro* et que cette interaction serait impliquée dans le recrutement d'EBNA1 sur la chromatine mitotique. Deux arguments viennent nuancer ce résultat (i) cette approche n'a pas été effectuée dans le contexte de la protéine entière et (ii) il a été démontré qu'un variant muté pour le domaine LR1 co-localisait toujours avec la chromatine métaphasique (Nayyar, Shire, and Frappier 2009).

6. Autres fonctions de la protéine EBNA1

Hormis son rôle majeur dans les mécanismes de maintien du génome viral, la protéine EBNA1 est impliquée dans de nombreux mécanismes importants pour le déroulement du cycle viral (Frappier 2012).

a. Activation de la transcription

L'interaction de la protéine EBNA1 avec le domaine FR induit l'expression d'un gène rapporteur placé en aval de FR et l'activation des promoteurs Cp et LMPp sur le génome viral (Reisman and Sugden 1986 ; Sugden and Warren 1989 ; T. A. Gahn and Sugden 1995). Cette activation de la transcription requiert les régions LR1 et LR2 de la protéine EBNA1 ainsi que le recrutement de la protéine BrD4. A l'inverse d'HPV, la protéine Brd4 n'intervient pas dans les mécanismes de maintien, comme l'ancrage aux chromosomes cellulaires, d'EBV (Lin *et al.* 2008). En 2013, Chen *et al.* décrivent la nucléoline comme un facteur clé dans l'interaction entre EBNA1 et le domaine FR, notamment dans l'activation de la transcription et le maintien du génome viral (Y.-L. Chen *et al.* 2014). Un siRNA dirigé contre la nucléoline entraîne une diminution de l'activité transcriptionnelle d'EBNA1 sur FR ainsi qu'une diminution de l'interaction d'EBNA1 avec l'*oriP*, cependant le rôle de la nucléoline *per se* n'est pas clairement établi. La nucléoline est impliquée dans la biogénèse des ribosomes ainsi que dans l'architecture de la chromatine. Son inhibition par siRNA entraine vraisemblablement une perturbation massive de la cellule notamment par une inhibition de la traduction. Ainsi l'inhibition observée pourrait provenir d'un effet secondaire du siRNA. Par ailleurs, il est surprenant d'observer l'inhibition de l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* étant donné que cette interaction a été décrite comme directe par de nombreux travaux.

De manière similaire à son interaction avec FR et DS, la protéine EBNA1 est capable d'interagir avec l'ADN cellulaire et une première étude par ChiP-Seq a identifié 247 promoteurs cellulaires sur lesquels EBNA1 est retrouvée à proximité (Dresang, Vereide, and Sugden 2009). Une analyse *in silico* de ces sites d'interactions a permis de montrer que 54 d'entre eux ont une séquence proche des séquences d'interaction de FR, DS et Rep*. De plus, cette analyse a identifié une nouvelle séquence d'interaction spécifique pour EBNA1. Cependant aucune des séquences identifiées placées en amont d'un gène rapporteur n'influence son expression. Une seconde étude, utilisant des puces transcriptomiques, démontre qu'il n'existe que peu de différence entre le profil ARN d'une lignée HEK-293 exprimant ou non la protéine EBNA1. Seuls 3 gènes dont la régulation est modulée par l'interaction d'EBNA1 avec leurs promoteurs ont été décrits : c-Jun, ATF et survivin (Canaan *et al.* 2009).

b. Effet sur la cellule

EBNA1 est impliqué dans les mécanismes de survie en interagissant avec différents facteurs cellulaires (**figure 17**). L'interaction avec la protéine USP7 est décrite comme pouvant inhiber l'expression de p53 dans des cellules U2OS (Saridakis *et al.* 2005). La coopération entre les protéines EBNA1, USP7 et CK2 induit la dégradation de la protéine PML (*ProMyelocitic Leukemia*), déstabilisant ainsi les corps PML (Sivachandran, Cao, and Frappier 2010 ; Frappier 2011). Cette déstabilisation se traduit par l'inhibition des mécanismes de réparation, de l'acétylation de p53 et de l'induction de l'apoptose en cas de dommage à l'ADN. De plus, lors du cycle productif, l'inhibition des corps PML par la protéine EBNA1 favorise l'expression des gènes viraux ainsi que la réplication du génome. A l'inverse, pendant la latence, l'expression de la protéine EBNA1 limite l'activation spontanée du cycle productif. L'induction de l'expression du microARN let7a par EBNA1 serait l'un des mécanismes impliqués dans le maintien de l'état latent (Mansouri *et al.* 2014).

7. LANA, orthologue d'EBNA1 pour KSHV (voir Ohsaki and Ueda 2012 pour référénces)

Le mécanisme de maintien du virus d'Epstein-Barr est très proche de celui employé par d'autres *Gammaherpesvirinae*. Parmi ceux-ci, le mécanisme de maintien de KSHV est le plus étudié et offre donc une possibilité de comparaison intéressante. Le virus du sarcome de Kaposi établit une latence au sein de lymphocytes B avec un profil d'expression des gènes viraux réduit. Le maintien du génome viral dépend de la protéine LANA (*Latency Associated Nuclear Antigen*) qui assure la ségrégation ainsi que la réplication du génome viral. LANA et EBNA1 présentent une homologie de séquence au niveau de leur NLS, ainsi que des structures secondaires et tertiaires similaires dans leurs parties C-terminales. LANA interagit

directement avec la chromatine cellulaire par un domaine situé en N-terminal, le *Chromatin Binding Domain* (CBS) cartographié entre les acides aminés 1 à 22, ainsi qu'avec l'*oriP*$_{KSHV}$ par son domaine C-terminal (aa 923 à 1162). De manière similaire à EBNA1, LANA recrute sur l'*oriP*$_{KSHV}$ les facteurs nécessaires à la formation du pré-RC permettant la réplication du génome viral lors de la phase S (ORC, Cdc6 et MCM). Ce recrutement s'effectue sur le domaine *oriP*$_{KSHV}$ qui se compose de deux régions d'interactions pour la protéine LANA : LBS1 et LBS2 (*LANA Binding Site*) et une région riche en GC de 32 pb. En mitose LANA permet la ségrégation du génome viral en interagissant simultanément avec la chromatine condensée et le génome viral. LANA interagit avec de nombreux facteurs impliqués dans son ancrage avec la chromatine comme les histones 1/2A/2B (Verma, Lan, and Robertson 2007), les protéines MeCP2, DEK, NuMa, CENP-F et Bub1. L'interaction entre LANA et les histones a notamment été cristallographiée en 2006. La structure obtenue révèle l'interaction de LANA avec un domaine acide en surface des histones 2A et 2B (Barbera *et al.* 2006). Il est intéressant de noter que la protéine LANA, en absence du génome viral, est distribuée sur l'ensemble des chromosomes mitotiques alors qu'en présence du génome celle-ci se présente sous forme de points. L'interaction de LANA avec le génome viral module donc la localisation de la protéine. En mitose, EBNA1 exprimée dans des conditions d'infection latente se présente également sous forme de points sur les chromosomes mitotiques que cela soit avec ou sans le génome viral.

LANA est également impliquée dans le pouvoir oncogénique de KSHV. LANA induit la dégradation des protéines p53, pRb ou encore VHL et induit l'expression de protéines impliquées dans des processus de tumorigenèse comme hTERT.

III. EBNA1 et cancers

1. Rôle d'EBNA1 dans les cancers associés à EBV

De nombreuses protéines du virus d'Epstein-Barr participent à l'oncogenèse, comme la protéine LMP1 ou les protéines de la famille des EBNA3. L'un des rôles d'EBNA1 dans le mécanisme de tumorigenèse est le maintien du génome viral au cours de la prolifération tumorale, ce qui permet l'expression de produits viraux dans l'ensemble des cellules de la tumeur. Cependant EBNA1 possède aussi un pouvoir oncogène qui a été décrit pour la première fois dans les années 1996 par Wilson *et al.* (J. B. Wilson, Bell, and Levine 1996). Pour cela, deux lignées de souris transgéniques ont été établies exprimant chacune la protéine EBNA1 seulement dans les cellules B. Les souris transgéniques présentent une forte incidence pour le développement de lymphome. De plus, les lymphocytes dérivés de ces tumeurs présentent une survie et une croissance cellulaire supérieures à la normale. Cependant, une seconde étude, similaire, n'a pas démontré de pouvoir oncogénique pour la protéine EBNA1 (Kang *et al.* 2008). Ceci suggère que le pouvoir oncogène d'EBNA1 pourrait

induire ou participer à un phénomène d'oncogenèse dans certaines conditions, notamment lié à son niveau d'expression. D'autres travaux ont démontré le pouvoir oncogène d'EBNA1 dans un contexte cellulaire. L'expression d'EBNA1 dans des cellules de lignées de NPC EBV négatives, de tumeur mammaire ou encore de carcinome gastrique augmente le pouvoir métastatique de la lignée après leur injection dans des souris *nude* (Sheu *et al.* 1996 ; Sheu 2009 ; Kaul *et al.* 2007).

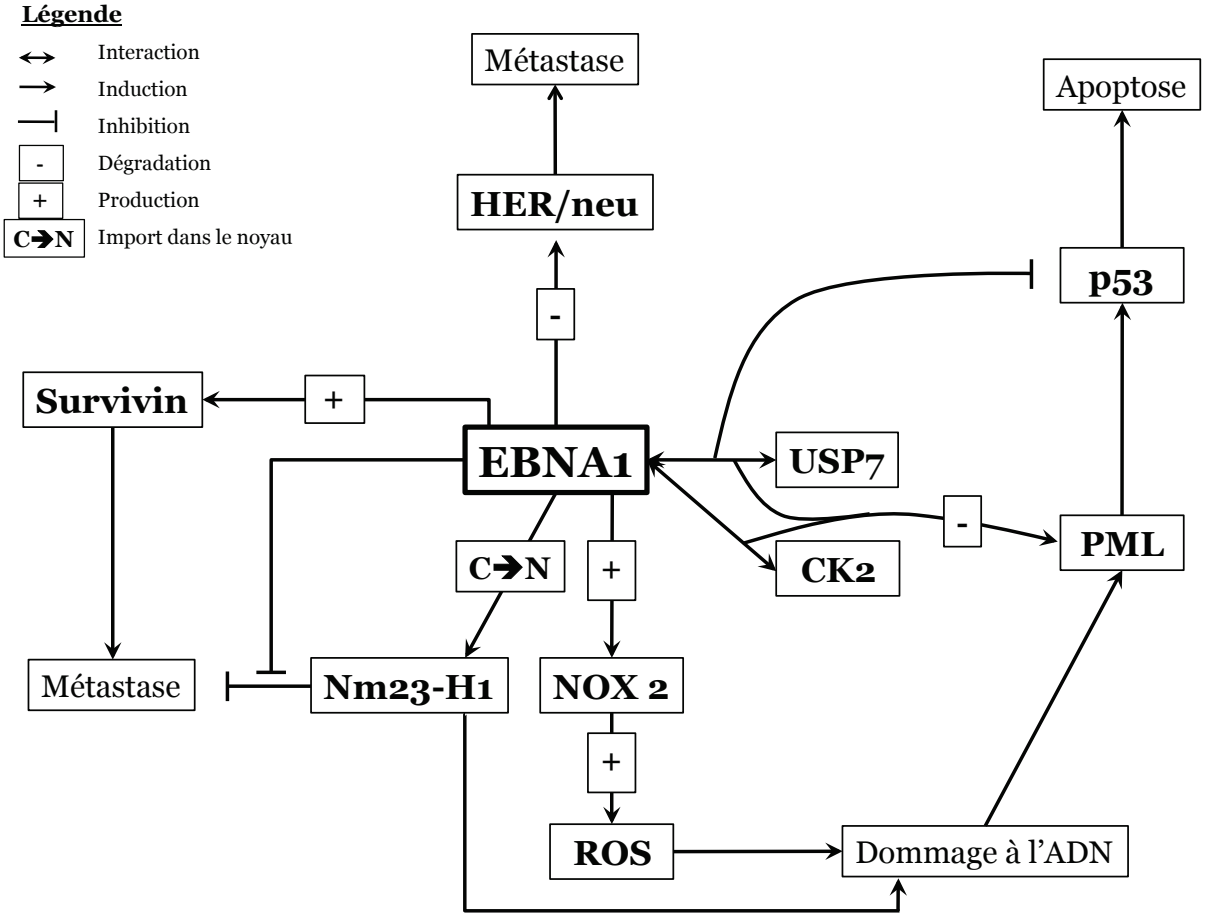


Figure 17 : Schéma de l'impact de la protéine EBNA1 dans le développement de tumeur

EBNA1 régule de nombreuses voies pouvant faciliter ou entretenir un état tumoral de la cellule. De manière intéressante, la dégradation de la protéine HER/neu présente un effet anti-métastatique, à l'inverse des autres effets décrits jusqu'à présent.

Comme décrit dans le paragraphe «Autres fonctions de la protéine EBNA1 », EBNA1 induit la dégradation de nombreuses protéines ayant un rôle anti-tumoral comme PML ou p53. EBNA1 induit également l'expression de la survivin en interagissant avec les facteurs Sp1 sur son promoteur (J. Lu *et al.* 2010). L'augmentation de l'expression de la survivin induit une augmentation de la résistance à l'apoptose. La survivin est également connue pour son rôle dans l'induction de métastases (Altieri 2015). EBNA1 perturbe également des voies de transduction impliquées dans la régulation de la prolifération ou de l'apoptose comme la voie

NF-κB (Valentine *et al.* 2010) ou la voie STAT. L'activation constitutive de la voie NF-κB dans des cellules épithéliales provoque un arrêt définitif du cycle cellulaire. Ainsi, son inhibition par EBNA1 bloquerait ce mécanisme (Seitz *et al.* 2000). Cette inhibition serait notamment importante dans le développement de NPC (Frappier 2012) ou de carcinomes gastriques associés à EBV. EBNA1 a également été démontrée comme responsable de l'augmentation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) et de la formation de foyers de dommage à l'ADN (Gruhne *et al.* 2009). Ainsi, de pair avec la dégradation de la protéine PML ainsi que de p53 diminuant l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN, l'expression d'EBNA1 participerait au phénomène de tumorigenèse en induisant des dommages à l'ADN non pris en charge par la cellule. EBNA1 inhibe l'expression du gène *HER2/neu*. Ce gène est retrouvé sur-exprimé dans de nombreuses tumeurs et promeut notamment le développement de métastases (Liu *et al.* 2009). Le rôle exact de la protéine EBNA1 dans le mécanisme de tumorigenèse reste donc encore ambigu mais de nombreux travaux abondent dans le sens d'un effet pro-tumoral notamment par l'induction de dommages à l'ADN (**figure 17**).

2. Stratégies thérapeutiques reposant sur la protéine EBNA1

La protéine EBNA1 est la seule protéine virale exprimée dans l'ensemble des pathologies associées à EBV. Ceci s'explique notamment par son rôle majeur dans les mécanismes de maintien du génome viral au cours des divisions cellulaires. Elle représente ainsi une cible de choix dans le traitement de pathologies associées à EBV. Deux approches distinctes sont exploitées : la première implique la présentation d'antigènes de la protéine EBNA1 à la surface des cellules infectées qui sont ensuite reconnues et détruites par le système immunitaire (Münz 2004). La seconde est fondée sur l'inhibition du maintien du génome viral en bloquant notamment l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP*.

a. Reconnaissance d'EBNA1 par le système immunitaire

Diverses stratégies sont développées afin de permettre la reconnaissance des cellules infectées par le système immunitaire. La première consiste à améliorer l'immunité du patient en augmentant la spécificité et le nombre de cellules T, déjà présentes dans l'organisme, dirigées contre la protéine EBNA1 notamment (voir Calarota *et al.* 2013 pour l'analyse de la réponse anti-EBNA1 chez des sujets sains). Ainsi un vaccin issu d'une version modifiée de la vaccine Ankara (MVA – *Modified Vaccinia Ankara*), codant pour les gènes EBNA1 et LMP2, a été testé dans 2 essais cliniques de phase I (Hui *et al.* 2013 ; Taylor *et al.* 2014). Les deux essais, réalisés en Chine et en Angleterre, démontrent une innocuité du vaccin même à haute dose et surtout une augmentation de l'activité préexistante des lymphocytes T dirigée contre EBNA1 et / ou LMP2 pour 80 % (étude en Chine) et 53 % (étude en Angleterre) des patients. L'utilisation de ce vaccin, en plus des thérapies classiques, fait actuellement l'objet d'un essai

clinique de phase II afin d'étudier son effet dans le traitement de pathologies tumorales associées à EBV. Un autre système consiste à prélever les monocytes de patients, à les co-cultiver avec des cellules autologues irradiées après infection par un vecteur adénoviral (exprimant les protéines LMP1/2 et EBNA1). Cette co-culture induit une expansion des cellules T spécifiques pour ces protéines virales. Un transfert adoptif est ensuite effectué pour chaque patient. Les patients ayant subi le transfert adoptif ont une médiane de survie de 523 jours contre 220 jours pour les patients contrôles. D'un point de vue immunologique, la fréquence de lymphocytes T dirigés contre la protéine EBNA1 augmente au cours du traitement, cependant cette fréquence retourne rapidement à l'état basal à la suite du dernier transfert. Bien que les résultats de cette étude clinique soient encourageants, la diminution des cellules T spécifiques après traitement démontre la nécessité d'un traitement à long terme dont l'efficacité n'est pas encore démontré et pour lequel le coût financier est important.

Une seconde stratégie consiste à améliorer la présentation de la protéine EBNA1 à la surface des cellules infectées pour que celles-ci soient plus efficacement reconnues par le système immunitaire. Dans ce but, Voisset *et al.* ont analysé la capacité de molécules chimiques à inhiber l'effet de la région Gly-Ala (Voisset *et al.* 2014), région qui inhibe la traduction de la protéine EBNA1. Pour cela, ils ont développé, et validé, un crible dans un modèle levure, organisme dans lequel le mécanisme d'inhibition de la traduction par la région Gly-Ala est conservé. Sur les 2 000 molécules testées, seules 2 se sont révélées capables d'inhiber l'effet de la région Gly-Ala sur la traduction : le 5-fluorouracile (5-FU) et la doxorubicine (DXR). L'analyse de l'effet de ces deux composés révèle qu'ils sont capables d'augmenter la présentation d'un polypeptide portant la région Gly-Ala. Cependant seule la DXR induit une augmentation spécifique des polypeptides en présence de Gly-Ala, le 5-FU augmentant la présentation des polypeptides avec ou sans la région Gly-Ala. Cette augmentation de présentation peut s'expliquer notamment par l'augmentation de la quantité de protéines produites. Ceci a notamment été montré pour la protéine EBNA1, en présence de DXR. L'utilisation de la DXR dans le traitement de pathologies associées à EBV nécessiterait de séparer l'effet sur la région Gly-Ala de son action génotoxique.

b. Inhibition du maintien du génome viral

De nombreuses protéines exprimées pendant la latence virale participent au développement et au maintien de l'état tumoral. Ainsi l'éradication du génome viral des cellules tumorales entrainerait la disparition de ces produits viraux et supprimerait l'effet pro-tumoral du virus. Pour cela trois approches sont développées : (i) l'inhibition de l'expression d'EBNA1 ; (ii) l'utilisation d'un dominant négatif de la protéine EBNA1

(dnEBNA1) ; (iii) l'inhibition de l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* à l'aide de composés chimiques. Toutes ces approches induisent à terme la perte du génome viral.

(i) Historiquement, la première approche employée a été celle de l'utilisation d'oligonucléotides antisens pour la région codante d'EBNA1 (Roth, Curiel, and Lacy 1994). Cette étude démontre l'inhibition de la prolifération de LCL après traitement par ces oligonucléotides antisens. Des études similaires utilisant cette fois l'ARN interférence dirigé contre l'ARN codant la protéine EBNA1 ont été effectuées et montrent des résultats similaires (Hong *et al.* 2006).

(ii) La première étude ayant développé un mutant d'EBNA1 dans le but d'inhiber le maintien du génome viral date de 2003 (Kennedy, Komano, and Sugden 2003). Le mutant le plus utilisé porte le domaine C-terminal (aa 451 à 641) fusionné avec le domaine NLS en N-terminal (mutant dnEBNA1). Ce mutant est incompétent pour l'ancrage aux chromosomes cellulaires, étape cruciale pour la réplication et la ségrégation du génome viral. Cependant, dnEBNA1 conserve la capacité d'interagir avec l'*oriP* et entre ainsi en compétition avec EBNA1 endogène. Kennedy *et al.* démontrent pour la première fois que l'expression de ce dnEBNA1 inhibe la prolifération de lignées dérivées de lymphome de Burkitt et que certaines lignées présentent également une augmentation de l'apoptose. Ces observations ont été confirmées par de nombreux travaux. Nasimuzzaman *et al.* ont exploité ce mutant, incorporé dans un vecteur adénoviral, sur d'autres lignées dérivées de lymphome de Burkitt (Nasimuzzaman *et al.* 2005) : de manière similaire, l'expression de dnEBNA1 dans les lignées Mutu-I et Akata induit une inhibition de la prolifération ainsi qu'une diminution du nombre d'épisomes viraux par cellule. De plus, l'effet de dnEBNA1 a été testé dans un contexte murin. Des souris inoculées par 10^7 cellules de la lignée Mutu-I par voie sous-cutanée et traitées par le vecteur codant dnEBNA1 présentent une tumeur deux fois plus petite par rapport aux souris traitées par un vecteur contrôle. Enfin, une étude confirme que la perte du génome viral entraine l'induction de l'apoptose pour certaines lignées (Oku-BL et PTLD1), vraisemblablement liée à l'expression du gène Bim (Vereide and Sugden 2011). Cependant, deux lignées dérivées de lymphome de Burkitt (Sav-BL et Dante-BL) présentent une diminution de la prolifération, après expression de dnEBNA1, sans induction de l'apoptose. Ces données suggèrent que les lignées infectées par EBV présentent une dépendance différente vis-à-vis du génome viral.

(iii) De nombreuses équipes se sont également intéressées à la caractérisation de molécules chimiques inhibant l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP*. En 2011, Chen *et al.* analysent l'effet de l'épigallocatechine-3-gallate (EGCG), un dérivé présent notamment dans le thé vert. Ils démontrent que l'EGCG est capable d'inhiber l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* (Y.-L. Chen, Tsai, and Peng 2012). Cette inhibition induit (i) une diminution de la prolifération de LCL ainsi que (ii) la perte d'un plasmide *oriP*-Luc dans une lignée $BJAB^{EBV-}$.

De leur côté, Yasuda *et al.* ont exploité la propriété des polyamides dérivés de pyrrole et d'imidazole à interagir avec l'ADN ainsi qu'à traverser facilement les membranes biologiques pour synthétiser trois polyamides dans le but d'inhiber spécifiquement l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* (Yasuda *et al.* 2011). Seul le polyamide DSE-3 est capable de bloquer l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP*, ainsi que la prolifération de LCL par induction de l'apoptose. DSE-3 inhibe également l'immortalisation de lymphocytes B primaires après infection par EBV.

De nombreuses autres études ont permis l'identification de molécules inhibant la fonction de la protéine EBNA1. Ces résultats sont autant de pistes possibles dans le traitement de pathologies associées au virus d'Epstein-Barr.

IV. Conclusion

La co-évolution entre les virus et leurs hôtes a conduit à la mise en place de mécanismes de maintien performants des génomes viraux dans les cellules infectées.

Dans le cas du virus d'Epstein-Barr, le maintien du génome repose sur l'expression d'une unique protéine virale, la protéine EBNA1. Elle assure la réplication et la ségrégation de l'épisome. Le domaine C-terminal d'EBNA1 interagit avec l'*oriP* tandis que le domaine N-terminal avec la chromatine cellulaire. De part son rôle majeur dans la biologie du virus d'Epstein-Barr, EBNA1 est une cible de choix dans le traitement de pathologies associées à EBV.

Bien que l'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* soit bien caractérisée, l'ensemble des études ne permet pas de dégager un mécanisme clair d'ancrage de la protéine EBNA1 aux chromosomes *via* son domaine N-terminal.

Regulator of Chromosome Condensation I – RCC1

Afin de mettre en évidence les partenaires de la protéine EBNA1 pouvant être impliqués dans l'interaction avec les chromosomes mitotiques, nous avons effectué un crible deux-hybrides en levure qui nous a permis d'identifier, entre autre, la protéine RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) comme partenaire potentiel.

RCC1 est une protéine nucléaire stricte présente chez tous les eucaryotes et exprimée de manière ubiquitaire dans tous les types cellulaires. La protéine RCC1, en interaction avec la protéine Ran, joue un rôle majeur tout au long du cycle cellulaire : transport nucléo-cytoplasmique et mise en place du fuseau mitotique. RCC1 interagit dynamiquement et directement avec la chromatine cellulaire à la fois avec les nucléosomes mais aussi avec l'ADN. Cette interaction est stabilisée lors de la mitose, ce qui fait de RCC1 un bon candidat pour faciliter l'ancrage d'EBNA1 aux chromosomes.

I. Structure et fonction de la protéine RCC1

1. Structure de RCC1

La structure tridimensionnelle de RCC1 a été résolue en 1998 avec une résolution de 1.7 Å (**figure 18-A** ; Renault *et al.* 1998). RCC1 présente une structure en hélice à 7 pales encadrée de petits domaines N- et C-terminaux non structurés. Les pales de l'hélice sont composées de séquences répétées d'environ 51 à 68 résidus, séquences qui ont par la suite été identifiées dans de nombreuses autres protéines et ainsi nommées RLR (RCC1 Like Repeat ; Stevens and Paoli 2008). Les pales de l'hélice forment chacunes 4 feuillets β antiparallèles. Les extrémités N- et C-terminales sont courtes, non structurées et exposées du même côté de l'hélice. Le domaine N-terminal possède un NLS bi-partite conférant sa localisation nucléaire à la protéine.

Des modifications post-traductionnelles ont été décrites pour RCC1, notamment au niveau de la queue N-terminale. Rapidement après la traduction, la méthionine 1 est clivée et la sérine 2 est mono-, di- ou triméthylée par la NRMT (*N-terminal RCC1 MethylTransferase* ; T. Chen *et al.* 2007 ; Schaner Tooley *et al.* 2010). La méthylation de RCC1 permet notamment de stabiliser son interaction avec la chromatine mitotique, les sérines 2 et 11 sont phosphorylées par le dimère cycline B/CDK1 lors de la mitose (Hutchins *et al.* 2004).

RCC1 interagit directement avec les nucléosomes : la structure de ce complexe a été résolue par cristallographie avec une résolution de 2,9 Å. Cette structure a été obtenue en utilisant Bj1, l'homologue de drosophile de RCC1 (**figure 18-B** ; Makde *et al.* 2010). RCC1 est présente de chaque côté du nucléosome à raison d'une protéine par face, donnant au complexe une forme de roue de tricycle, avec le nucléosome pour roue et les protéines RCC1 en guise de pédales, orientées à 90° par rapport au nucléosome. La pale 4 de l'hélice de RCC1 interagit directement avec les histones H2A et H2B. Plus précisément, l'interaction se fait

entre une boucle de la pale 4 et une poche acide du nucléosome. Cette conformation présente ainsi une grande surface disponible pour des interactions avec divers facteurs, notamment la protéine Ran, dont la structure en interaction avec RCC1 a été publiée en 2001 (**figure 18-C** ; Renault *et al.* 2001). La protéine Ran interagit de manière homogène avec l'ensemble de l'hélice de RCC1 à l'exception d'une protubérance de la pale 3 de RCC1 pour laquelle l'interaction est favorisée. La comparaison entre la structure de Ran seule ou en interaction avec RCC1 montre une flexibilité des régions *switch I* et *II* ainsi que des hélices α3 et α4 de la protéine Ran. Cette flexibilité est impliquée dans l'échange du GDP en GTP ainsi que dans la liaison avec les importines.

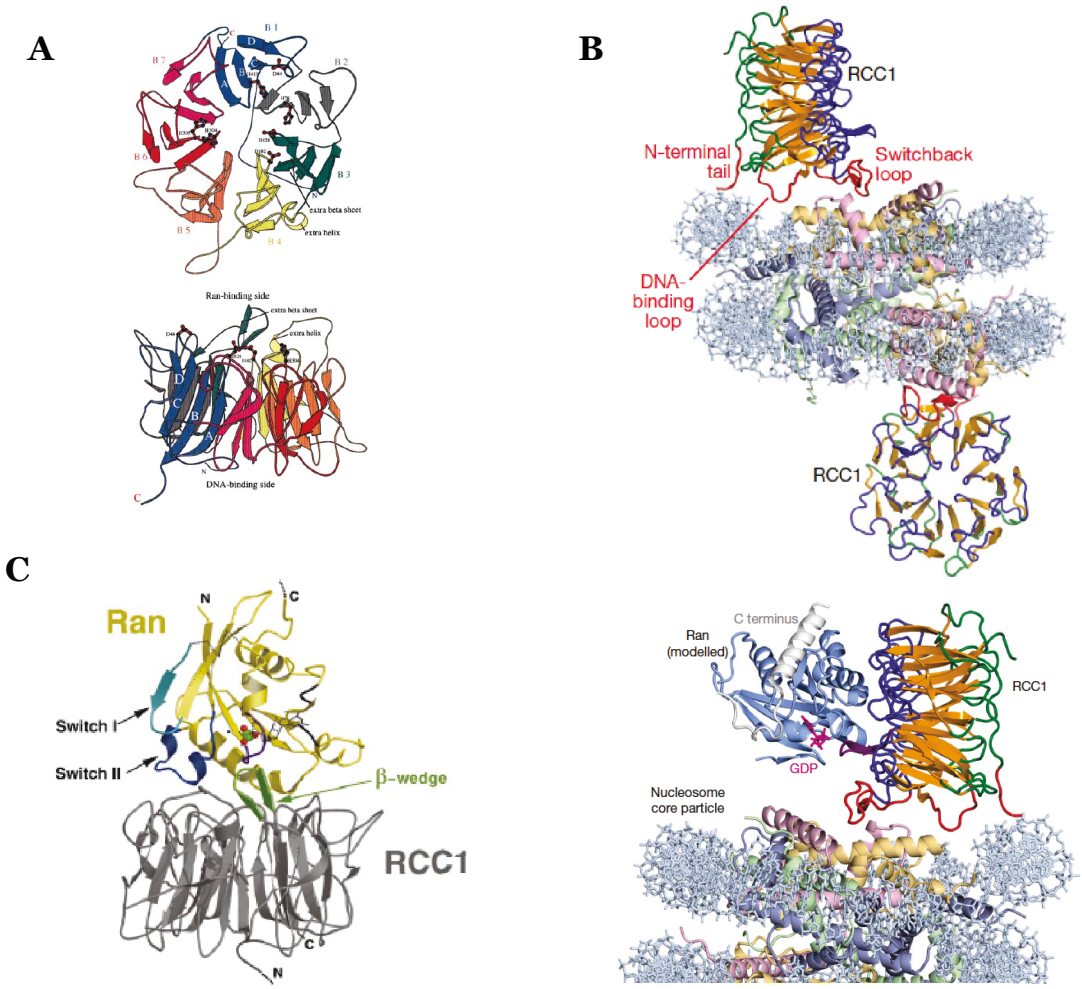


Figure 18 : Structure cristallographique de la protéine (A) RCC1 seule (d'après Renault *et al.* 1998), en interaction (B) avec le nucléosome (haut) et la protéine Ran (bas ; d'après Makde *et al.* 2010) ou (C) la protéine Ran seul (Renault *et al.* 2001)

RCC1 interagit également avec l'ADN du nucléosome *via* une boucle de liaison à l'ADN située sur la quatrième pale de l'hélice (*DNA binding loop*), cette interaction se fait sur le squelette phosphate de l'ADN confirmant l'absence de spécificité de séquence pour l'interaction de RCC1 avec la chromatine. Le domaine N-terminal de RCC1, non structuré, interagit également avec l'ADN et les nucléosomes. Les acides-aminés 22-27 (KAKRAR) sont notamment importants dans la stabilisation du complexe RCC1-nucléosome pour la formation du cristal (England *et al.* 2010).

Trois isoformes de la protéine RCC1 ont été décrites (Hood and Clarke 2007) : RCC1-α, -β et –γ. Ces isoformes sont issues d'un épissage alternatif différent au niveau de l'exon 6, ce qui se traduit par une différence dans la longueur de la queue N-terminale. L'isoforme α est retrouvée dans un grand nombre de tissus à l'exception de l'intestin grêle, des poumons et de l'estomac. Les isoformes β et γ semblent ubiquitaires et majoritaires dans les poumons et l'estomac. D'un point de vue fonctionnel, les isoformes α et γ sont capables de transcomplémenter une lignée déficiente pour la protéine RCC1. De plus, RCC1-γ interagit plus stablement avec la chromatine que RCC1-α, l'isoforme β n'a pas été testée pour sa capacité de transcomplémentation.

2. Fonctions de RCC1 et dynamique d'interaction avec la chromatine

RCC1 est le seul facteur échangeur de guanine nucléaire pour la petite protéine GTPase Ran décrit pour le moment (Ran-GEF - *Guanine Echange Factor*). RCC1 catalyse l'échange d'un GDP pour un GTP lié à la protéine Ran. Cette activité catalytique est impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique, mais également dans la mise en place du fuseau mitotique. L'interaction avec Ran ainsi que les modifications post-traductionnelles de RCC1 modulent son interaction avec la chromatine au cours du cycle cellulaire, notamment en mitose.

a. Transport nucléo-cytoplasmique en interphase (pour référence voir Clarke & Zhang 2008)

En interphase, le transport nucléo-cytoplasmique de macromolécules, comme les protéines, est régulé par de nombreux facteurs d'import et d'export. Ces facteurs, pour être fonctionnels, doivent pouvoir transiter rapidement d'un compartiment à l'autre. Le cycle effectué par la protéine Ran est régulé par la Ran-GEF, RCC1, qui dans le noyau remplace le GDP lié à Ran par un GTP et ainsi induire son export. L'interaction entre Ran et RCC1 induit une translocation du complexe sur la chromatine ce qui catalyse l'échange du GDP en GTP. À l'inverse, dans le cytoplasme, une Ran-GAP (*GTPase Activating Protein*) permet l'hydrolyse du GTP en GDP et l'import de Ran dans le noyau. Les protéines RanBP1/2 interagissent avec Ran-GAP et catalysent l'hydrolyse du GTP. Il y a donc une majorité de protéine Ran-GTP dans le noyau et Ran-GDP dans le cytoplasme. La forme Ran-GDP n'est pas directement

impliquée dans le transport nucléo-cytoplasmique mais induit la translocation de la fraction de protéine Ran dans le cytoplasme vers le noyau. À l'inverse la forme Ran-GTP est impliquée à la fois dans l'export mais aussi dans l'import de protéine portant un NES ou un NLS. Les complexes impliqués dans le transport nucléaire se forment dans le cytoplasme. L'une des voies est celle des importines α et β : une protéine portant un NLS riche en lysine interagit avec le dimère importines α-β, ce qui induit la translocation du complexe dans le noyau. Dans le noyau, Ran-GTP interagit avec l'importine β ce qui dissocie le complexe et libère l'importine α et la protéine transportée. Concernant l'export, Ran-GTP interagit avec la protéine Crm1. Cette interaction induit un changement de conformation de Crm1, augmentant son affinité pour des protéines contenant un NES riche en leucine. Ce complexe est exporté et dissocié dans le cytoplasme à la suite de l'hydrolyse du GTP en GDP par Ran-GAP associée à ses co-facteurs RanBP1/2 (**figure 19**).

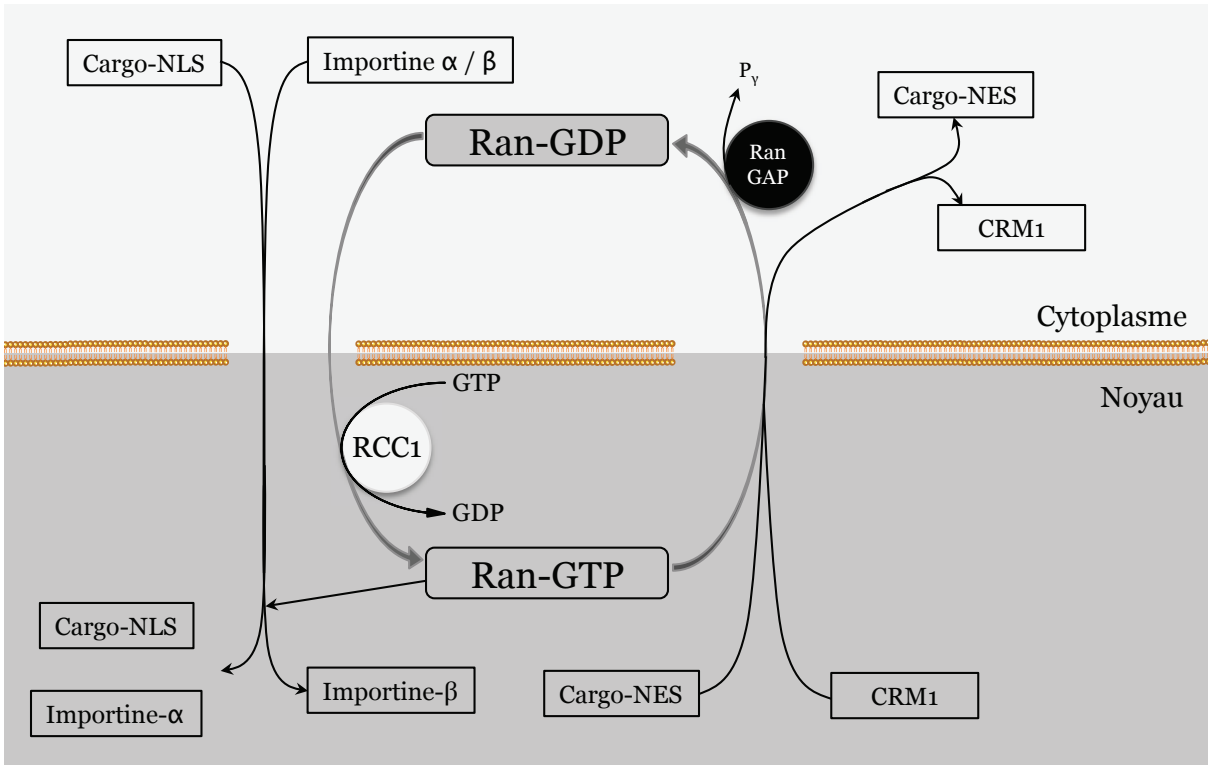


Figure 19 : Transport nucléo-cytoplasmique dépendant de la protéine RCC1 en interphase

En interphase, la protéine Ran est présente majoritairement sous forme Ran-GTP dans le noyau et Ran-GDP dans le cytoplasme. La forme GDP est importée dans le noyau et le GDP est remplacé par un GTP par la protéine RCC1. La forme Ran-GTP permet la dissociation des complexes Importine/cargo ce qui libère les protéines portant un NLS dans le nucléoplasme. Par la suite Ran-GTP interagit avec Crm1, ce qui induit le recrutement d'une protéine portant un NES et l'export vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, ce complexe se dissocie, le GTP est hydrolysé par la protéine Ran-GAP (les co-facteurs RanBP1 et RanBP2, non représentés, catalysent la reaction).

Enfin, RCC1 pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'apoptose suite à des dommages à l'ADN. En effet, une étude a porté sur l'interaction de RCC1 avec la chromatine dans un contexte apoptotique. L'induction de l'apoptose par l'étoposide induit la phosphorylation de l'histone H2B sur la sérine 14. Cette phosphorylation stabilise l'interaction de RCC1 avec la chromatine et cette stabilisation inhibe l'échange du GDP pour un GTP par RCC1, ce qui se traduit par une augmentation de la quantité de Ran-GDP et donc le blocage du transport nucléo-cytoplasmique. Ainsi, les auteurs démontrent que l'arrêt du transport bloque l'import de facteurs capables d'inhiber l'apoptose comme le complexe NF-κB-p65 (Wong *et al.* 2009).

b. Mise en place du fuseau mitotique

De nombreux points de contrôle régulent le bon déroulement de la mitose. La mise en place du fuseau de microtubules et l'ancrage des kinétochores, permettant la ségrégation des chromatides sœurs à chaque pôle de la cellule, sont deux étapes clés de la mitose (**figure 20**). Les microtubules en interaction avec les kinétochores sont nommés fibres K. Les protéines SAFs (*Spindle Assembly Factors*) régulent positivement la nucléation et l'organisation des microtubules lorsque ceux-ci ne sont pas en interaction avec les importines (NuMA, TPX2, HURP ou encore XCTK2 ; Gruss *et al.* 2001 ; Silljé *et al.* 2006 ; Weaver *et al.* 2015). En mitose, la queue N-terminale de RCC1 est phosphorylée, cette phosphorylation inhibe l'interaction entre le NLS de RCC1 et les importines α et β (H.-Y. Li and Zheng 2004). Ainsi RCC1 est distribuée sur l'ensemble de la chromatine condensée et crée un gradient de Ran-GTP/Ran-GDP avec une concentration de la forme GTP croissante des centrosomes aux chromosomes. Cet ancrage est crucial pour la mise en place du fuseau mitotique (Moore, Zhang, and Clarke 2002). Ainsi, en interagissant avec l'importine β, Ran-GTP libère les SAFs ce qui permet la nucléation des microtubules vers les chromosomes. En absence d'enveloppe nucléaire, la fraction de RCC1 cytosolique interagit avec les protéines Ran et Ran-BP1. Ce tri-complexe est situé exclusivement dans le cytosol et n'interagit pas avec la chromatine. Au sein de ce complexe, la protéine RCC1 n'est pas capable de catalyser l'échange du GDP en GTP sur la protéine Ran (M. S. Zhang, Arnaoutov, and Dasso 2014). Cette inhibition de l'activité catalytique de RCC1 permet de maintenir un gradient de Ran-GTP autour des chromosomes et ainsi d'éviter la nucléation des microtubules de manière désorganisée. Li *et al.* (Hoi Y. Li *et al.* 2007) ont modélisé la concentration de Ran-GTP autour de la chromatine mitotique. Ils montrent que l'alignement correct de l'ensemble des chromosomes induit une forte concentration de Ran-GTP qui serait suffisante pour la transition métaphase-anaphase. La phosphorylation de RanBP1 à la transition métaphase-anaphase désorganise le tri-complexe et permet la re-localisation de la fraction cytosolique de RCC1 au niveau des chromosomes.

La protéine Crm1 est retrouvée ancrée aux kinétochores, sans que le mécanisme de recrutement ne soit connu. En mitose, Crm1 est phosphorylée ce qui augmente son affinité pour Ran-GTP et permet le recrutement du complexe RanGAP-RanBP1/2 (Arnaoutov *et al.* 2005 ; Wu *et al.* 2013). En 2008, Torosantucci *et al.* démontrent que ce complexe est responsable de la mise en place des fibres K (Torosantucci *et al.* 2008). Le mécanisme de mise en place des ces fibres a été identifié par la suite. Le complexe nucléoporine Nup107-160 est recruté spécifiquement sur les kinétochores par la protéine Crm1. Nup107-160 permet le recrutement du complexe γ-TuRC (γ-*Tubulin Ring Complex*). Enfin, l'inhibition des importines par Ran-GTP permet le recrutement de la protéine TPX2. γ-TuRC et TPX2 permettent, respectivement, la nucléation et l'ancrage des fibres K sur les kinétochores (Forbes *et al.* 2015 ; Scrofani *et al.* 2015).

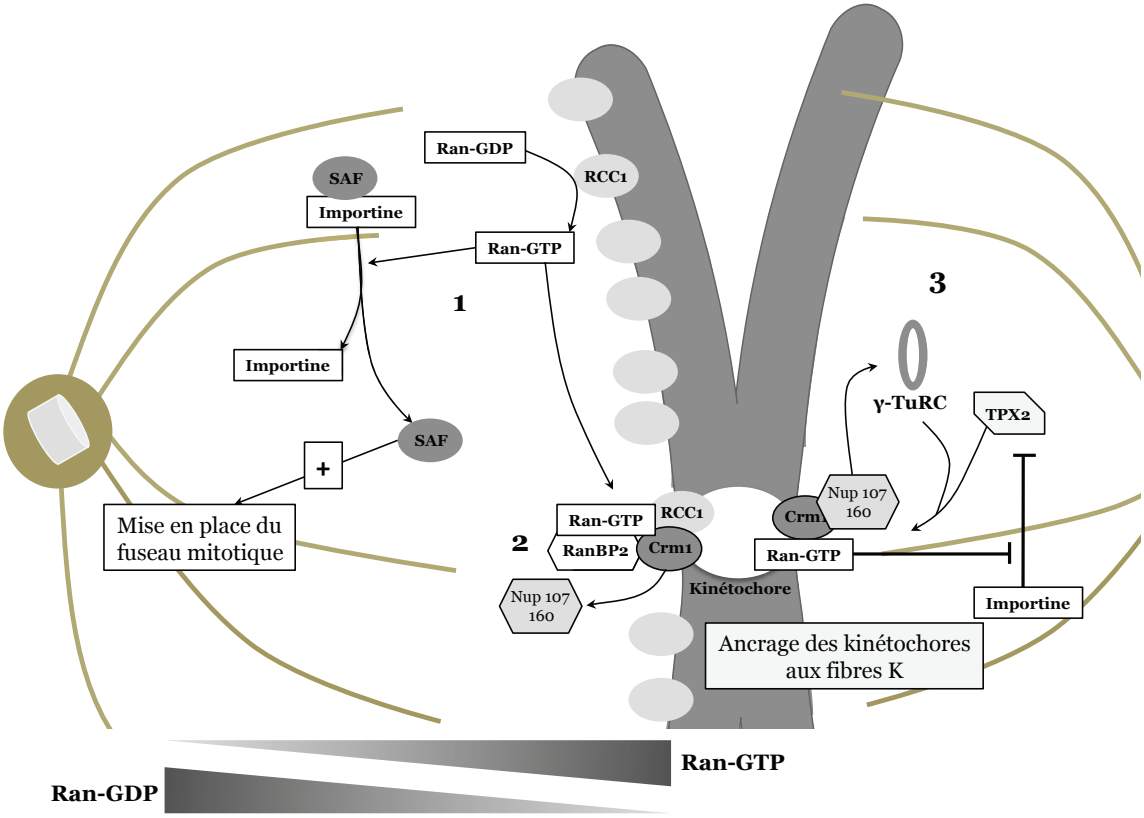


Figure 20 : Régulation de la Mise en place du fuseau mitotique par la protéine Ran

(1) L'interaction de RCC1 avec la chromatine en mitose permet la création d'un gradient de la protéine Ran-GTP. La forme Ran-GTP dissocie les complexes SAF-Importine ce qui permet la nucléation des microtubules du nucléosome vers les chromosomes condensés.
(2) Le recrutement des protéines Crm1, Ran-GTP, RCC1 et RanBP2 sur les kinétochores permet le recrutement de nombreux facteurs. Le recrutement du complexe Nup107-160 par Crm1 permet le recrutement du complexe γ-TuRC, Ran-GTP permet le recrutement de TPX2, γ-TuRC et TPX2 étant important (3) pour l'ancrage des fibres K.

Le gradient de Ran-GTP/GDP est également impliqué dans la formation du noyau en télophase. L'importine β interagit avec les précurseurs de l'enveloppe nucléaire (vésicules et nucléoporines). De plus, ce complexe interagit, *via* l'importine β, avec l'importine α et des protéines portant un NLS. Le gradient de Ran-GTP permet de dissocier le complexe importine α-β des précurseurs de l'enveloppe nucléaire en périphérie proche de la chromatine, permettant ainsi la formation du noyau autour de la chromatine spécifiquement (Q. Lu *et al.* 2012).

c. *Dynamique d'interaction entre RCC1 et la chromatine cellulaire*

De nombreux travaux ont été effectués dans le but d'analyser l'interaction de la protéine RCC1 avec la chromatine cellulaire. En 2001, Nemergut *et al.* démontrent que l'interaction entre RCC1 et les histones H2A/H2B augmente l'activité catalytique de la protéine RCC1 vis-à-vis de Ran (Nemergut *et al.* 2001). La queue N-terminale joue un rôle majeur dans l'interaction avec la chromatine. La délétion de l'intégralité de l'extrémité N-terminale ne permet plus l'ancrage de RCC1-α sur les chromosomes mitotiques (Moore, Zhang, and Clarke 2002). La méthylation de la sérine 2 permet la stabilisation de RCC1, en interaction avec Ran, sur la chromatine (Hitakomate *et al.*, 2010). De plus, des mutants défectifs pour la méthylation de la sérine 2 ont une localisation diffuse autour des chromosomes et une plus grande mobilité que la protéine méthylée. Enfin, l'interaction entre RCC1 et Ran induirait un changement de conformation de la queue N-terminale de RCC1 ce qui augmenterait son affinité pour la chromatine (Hoi Yeung Li, Wirtz, and Zheng 2003 ; Hao and Macara 2008). En 2013, Bierbaum *et al.* publient un travail exploitant la spectroscopie par corrélation de fluorescence (SCF), un outil puissant permettant d'analyser le mouvement de molécules fluorescentes dans un faible volume (Bierbaum and Bastiaens 2013). Ils démontrent que l'interaction entre RCC1-γ et la chromatine est plus stable en mitose, avec une constante de dissociation k_{off} de 2.43±1.44 /s pour la chromatine métaphasique, qu'en interphase, avec un k_{off} de 4.58±0.94 /s, sans que la constante de diffusion ne change (environ 6.2 $\mu m^2/s$). A l'inverse de ce qui avait été publié par le passé (Hutchins *et al.* 2004), les auteurs démontrent que la phosphorylation des sérines 2 et 11 n'affecte pas la dynamique de RCC1. Enfin, la délétion du domaine N-terminal de RCC1 (aa 1-27) augmente fortement sa constante de dissociation en interphase (k_{off} = 14.8±4.47 /s), cependant la constante de dissociation en mitose reste toujours plus faible (k_{off} = 5.39±2.23 /s) que celle observée en interphase, ce qui démontre la capacité de la protéine à interagir plus stablement avec la chromatine en mitose malgré l'absence du domaine N-terminal. Il est intéressant de noter que dans le cas de l'isoforme γ, la délétion des 27 premiers acides aminés n'empêche pas l'interaction avec les chromosomes. Ces données confirment donc le rôle de cette région dans l'interaction avec la chromatine mais suppose un mécanisme de stabilisation qui en est indépendant.

Résultats

I. Article

L'interaction de la protéine virale EBNA1 avec la chromatine mitotique est une étape nécessaire pour le maintien du génome viral. Alors que l'interaction entre EBNA1 et les régions FR et DS est bien caractérisée, le mécanisme d'ancrage d'EBNA1 aux chromosomes mitotiques reste encore mal décrit. Cette dernière décennie, l'interaction directe entre EBNA1 et la chromatine mitotique a été la piste privilégiée. Deux études en particuliers sont à citer : Sears *et al.* démontrent que les régions LR1 et LR2, impliquées dans l'interaction avec la chromatine mitotique, possèdent des domaines AT-Hook capable d'interagir avec une sonde poly (dA-dT) *in vitro*. Au cours de notre étude, nous avons montré que la protéine EBNA1, fusionnée à la GFP et dont les domaines AT-hook ont été retirés, se localise sur les chromosomes en mitose. Ces données suggèrent une interaction indirecte entre la protéine EBNA1 et la chromatine et donc l'implication d'un facteur cellulaire. Le crible deux hybrides effectué au laboratoire a permis d'identifier la protéine RCC1 comme partenaire potentiel d'EBNA1. Les caractéristiques de la protéine RCC1 en font un très bon candidat pour l'ancrage de la protéine EBNA1 aux chromosomes mitotiques. Nous avons validé l'interaction entre EBNA1 et RCC1 en exploitant de nombreuses approches biochimiques mais également des outils de microscopie. L'utilisation de mutants nous a permit d'identifier les domaines impliqués dans l'interaction entre ces deux protéines. Par ailleurs, en collaboration avec l'équipe de Joanna Wilson, nous avons exploité une approche par puce peptidique permettant d'identifier de nouvelles régions d'interactions de la protéine EBNA1 avec la protéine RCC1. Cette approche nous a permit de valider les domaines identifiés précédemment mais également d'identifier deux nouveaux domaines. Une approche par co-immunoprécipitation de la chromatine démontre que la protéine RCC1 est recrutée sur l'*oriP* spécifiquement en présence de la protéine EBNA1. Enfin, l'interaction entre EBNA1 et RCC1 est maximum en métaphase comme le montre nos résultats de FRET. L'ensemble de nos données suggère que la protéine RCC1 est impliquée dans l'ancrage de la protéine EBNA1 aux chromosomes mitotiques.

New insights regarding the Epstein Barr virus EBNA1 protein binding to mitotic chromosomes

Thibaut Deschamps[1,3,4,5,6], Quentin Bazot[1,3,4,5,6¶], Dimitri Mompelat[1,3,4,5,6,♯], Derek M. Leske[7], Ruth MacLeod[7], Lionel Tafforeau[2,3,4,5,6°], Vincent Lotteau[2,3,4,5,6], Vincent Maréchal[8, 9,10], George S. Baillie[7], Joanna B. Wilson[7], Henri Gruffat[1,3,4,5,6] and Evelyne Manet[1,3,4,5,6 *]

[1] CIRI, International Center for Infectiology Research, Oncogenic Herpesviruses team, Université de Lyon, Lyon, 69364, France

[2] CIRI, International Center for Infectiology Research, Cell Biology of Viral Infections team, Université de Lyon, Lyon, 69364, France

[3] INSERM, U1111, Lyon, 69364, France

[4] CNRS, UMR5308, Lyon, 69364, France

[5] Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, 69364, France

[6] Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, 69364, France

[7] College of Medical, Veterinary and Life Sciences University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK

[8] UPMC Université Paris 6, UMR 872, Paris, France

[9] CNRS, Institut Jacques Monod, UMR 7592, France

[10] Université Paris-Diderot, Institut Jacques Monod, UMRS 7592, Paris, France

* To whom correspondence should be addressed. Tel: +(33) 472-728-176; Fax: +(33) 472-728-137; Email: evelyne.manet@ens-lyon.fr

° Present address : Lionel Tafforeau, RNA Metabolism, IBMM, ULB, Brussels, Belgium

¶ Present address: Quentin Bazot, Section of Virology, Department of Medicine, Imperial College London, St Mary's Campus, London, UK

♯ Present address: University Joseph Fourier, Pathogenesis and Lentiviral Vaccination laboratory, Grenoble, France.

Résumé

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpesvirus associated with several human cancers. In proliferating latently-infected cells, the EBV genome persists as a circular plasmid that is replicated once per cell cycle and partitioned at mitosis. Both of these processes require a single viral protein, Epstein Barr nuclear antigen 1 (EBNA1), which binds to two clusters of cognate binding sites within the origin of plasmid replication (*oriP*). EBNA1 plays an essential role both in viral episome replication, by recruiting the cellular complex of DNA replication onto the *oriP,* and in the efficient segregation of the viral episomes, by tethering the viral DNA onto the mitotic chromosomes. Whereas the mechanisms of viral DNA replication have been well documented, the mechanisms involved in tethering EBNA1 to the cellular chromatin are far from being understood. Here we have identified Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) as a novel EBNA1 cellular partner. RCC1 is the only known nuclear guanine nucleotide exchange factor (RanGEF) for the small GTPase Ran enzyme. RCC1, associated with chromatin, is involved in the formation of RanGTP gradients critical for nucleo-cytoplasmic transport, mitotic spindle formation, and nuclear envelope reassembly after mitosis. We have used several approaches to demonstrate a direct interaction between these two proteins and have shown that the EBNA1 LR1 and LR2 domains, known to be responsible for EBNA1 tethering to the mitotic chromosomes, are also involved in the interaction with RCC1. The use of an EBNA1 peptide array not only confirmed the interaction of RCC1 with the LR1 and LR2 regions but also revealed an interaction with the C-terminal acidic tail of EBNA1 and a small region spanning amino acids 411 to 420. We have also characterized the interaction domains within RCC1. RCC1 has structured as a seven-bladed propeller structure with small unstructured N- and C-terminal tails: we have found that the N-terminal tail (residues 1-20) is a primary interaction domain for EBNA1. Moreover, by using Chromatin ImmunoPrecipitation assay (ChIP) we have shown that RCC1 is enriched in the *oriP* region of mini viral replicons in a manner dependent on EBNA1. Finally, by using a combination of confocal microscopy and FRET analysis to follow the dynamics of interaction between the two proteins throughout the cell cycle, we have demonstrated that EBNA1 and RCC1 closely associate on the chromosomes during metaphase. Taken together, our data strongly suggest an essential role for RCC1 in tethering EBNA1 - linked to the viral episome - to the metaphasic chromosomes.

Introduction

Epstein-Barr virus (EBV) is a ubiquitous herpesvirus associated with several human cancers, both in immuno-competent individuals (Burkitt's lymphoma, Hodgkin's disease (HD), rare T-cell and NK-cell lymphomas, undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC), gastric carcinomas) and immuno-compromised individuals (lymphoproliferations and lymphomas, in particular in post-transplant patients (for a review see (Crawford, 2001). The primary infection is usually asymptomatic when occuring in childhood but later in life can result in the Infectious Mononucleosis (IM). Following the primary infection, the virus persists in a life-long latent state in the memory B cells of infected individuals with intermittent viral production occurring in the oropharynx. *Ex vivo,* EBV has the unique capacity to induce growth transformation of resting primary human B-lymphocytes upon their infection, leading to the establishment of lymphoblastoid cell lines (LCLs). In such cell lines, there is no virus production but nine viral proteins - six nuclear antigens (EBNAs 1, 2, 3A, 3B, 3C and LP) and three membrane proteins (LMPs 1, 2A and 2B) - as well as several non-coding RNAs and miRNAs are expressed. These act in concert to induce and maintain continuous proliferation (for a review see (Cai *et al.*, 2006; Kieff and Rickinson, 2007).

In latently infected cells, the EBV genome persists as multicopy covalently closed double-stranded cellular episomes. When cells proliferate, these episomes replicate once per cell-cycle, during S phase, via use of the cellular machinery of DNA replication, and are subsequently evenly segregated to the daughter cells, such that a constant copy number of EBV genomes is maintained throughout cell divisions (Adams, 1987; Nanbo *et al.*, 2007; Yates and Guan, 1991). Both replication and segregation depend on the presence of only two viral elements, the EBV *cis*-acting origin of plasmid replication (*oriP*) and the viral protein EBNA1 (Yates *et al.*, 1984, 1985). *oriP* is composed of two functional elements 1 kbp distant from one another, the dyad symmetry (DS) element and the family of repeats (FR) (Reisman *et al.*, 1985). Both elements contains recognition sites for the EBNA1 protein. The DS element which contains four EBNA1 binding sites arranged in pairs is required for DNA replication initiation (Rawlins *et al.*, 1985; Reisman *et al.*, 1985; Wysokenski and Yates, 1989). EBNA1 participates to EBV genome replication by recruiting the ORC complex on the DS element of the *oriP,* thus allowing the formation of the pre-RC (pre-replicative complex) (Chaudhuri *et al.*, 2001; Ritzi *et al.*, 2003; Schepers *et al.*, 2001). The FR element consists of an array of twenty imperfect 30 bp repeats, each one containing an 18 bp EBNA1 binding site (Rawlins *et al.*, 1985; Reisman *et al.*, 1985). FR functions by tethering the viral episomes to human metaphase chromosomes via EBNA1 (Sears *et al.*, 2003, 2004; Wu *et al.*, 2000, 2002). In the presence of EBNA1, FR ensures the stable retention of *oriP* episomes within the cells with a plasmid loss rate of 3-5% per generation (Kirchmaier and Sugden, 1995; Little and Schildkraut, 1995; Nanbo *et al.*, 2007). More recently, an essential role for FR in viral

episome replication has also been demonstrated, with FR-dependent tethering of EBNA1 to host chromosomes during interphase being essential for the EBV episome to be replicated efficiently (Hodin *et al.*, 2013).

EBNA1 is a homo-dimeric, DNA-binding protein that recognises a 18 bp palindromic sequence present in multiple copies in the DS and FR elements, via its C-terminal domain (residues 459-607) (Ambinder *et al.*, 1990, 1991; Bochkarev *et al.*, 1996; Frappier and O'Donnell, 1991; Jones *et al.*, 1989; Rawlins *et al.*, 1985; Shah *et al.*, 1992) and can associate with metaphase chromosomes via its N-terminal. This N-terminal region carries two domains, the so-called Linking Regions 1 (LR1: aa 40-89) and 2 (LR2: 325-379) which confer intramolecular "linking" between EBNA-1 DNA complexes as revealed by electrophoresis mobility shift assays (EMSA) (Mackey *et al.*, 1995). Each of these domains consists of a region rich in arginine and glycine (RGG-rich region: GR1 and GR2 respectively) and a unique region (UR1 and UR2 respectively). The RGG-rich regions possess intrinsic AT-hook activity allowing binding to AT-rich DNA (Sears *et al.*, 2003, 2004). Moreover, the use of netropsin - a drug that binds the minor groove of AT-rich DNA - leads to the loss of EBV genomes from epithelial and lymphoid cells in an AT-hook dependent manner (Chakravorty and Sugden, 2015). These regions have also been found to be important for EBNA1 replication and transcription activity (Mackey and Sugden, 1999). EBNA1 attachment to metaphase chromosomes has been mapped to three independent chromosome binding sites (CBS) - CBS-1 (aa 72 to 84), CBS-2 (aa 328 to 365) and CBS-3 (aa 8 to 54) - that correlate well with the ability of EBNA1 to confer plasmid maintenance (Kanda *et al.*, 2001; Marechal *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2002). However, the mechanisms responsible for EBNA1 interaction with mitotic chromosomes are still unclear. It has been proposed that the AT-hook structure within the LR1 and LR2 regions could be directly responsible for EBNA1 attachment to the chromosomes (Kanda *et al.*, 2013; Sears *et al.*, 2004). EBNA1 may also interact with chromatin through protein-protein interactions with one or several cellular partners. hEBP2 (human Epstein-Barr Binding Protein 2) was the first cellular protein of the sort identified. hEBP2 was isolated from a two-hybrid screen as a putative EBNA1 partner and found to be involved in EBNA1 association to the mitotic chromosomes (Kapoor *et al.*, 2005; Nayyar *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2000). hEBP2 binds to a GRR-rich region of EBNA1 that has been mapped between aa 325 and 376 (Shire *et al.*, 1999) and which corresponds to the CBS-2 region. In a yeast model, hEBP2 was found to be required - in the presence of EBNA1 - for the maintenance of a plasmid carrying the EBV FR sequence (Kapoor and Frappier, 2003; Kapoor *et al.*, 2001). However, a recent study demonstrated that hEBP2 and EBNA1 do not interact during mitosis in living mitotic cells, suggesting that the involvement of hEPB2 might not be direct (Jourdan *et al.*, 2012). More recently, HMGB2 (high-mobility group box 2), a well known chromatin component, has been identified as a new partner for EBNA1

(Jourdan *et al.*, 2012). EBNA1 interacts with HMGB2 on chromatin during interphase and mitosis and its depletion partially alters EBNA1 association to the chromosomes. However, HMGB2 depletion is not sufficient to alter EBV episomes maintenance in Raji cells (Jourdan *et al.*, 2012). Taken together, these results suggest that several mechanisms cooperate to both favour EBNA1 association to the chromosomes throughout mitosis and maintenance of the EBV genome within proliferating cells.

In order to identify novel proteins that could play a role in EBNA1 chromosomal binding, we performed a yeast two-hybrid screen. From this screen, we identified Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) as a putative EBNA1 partner. RCC1 is the only known nuclear guanine nucleotide exchange factor (RanGEF) for the small GTPase Ran enzyme. RCC1, associated with chromatin, is involved in the formation of RanGTP gradients critical for nucleo-cytoplasmic transport (Riddick and Macara, 2005), mitotic spindle formation and nuclear envelope reassembly after mitosis (Askjaer *et al.*, 2002; Bamba *et al.*, 2002). RCC1 is a ubiquitous nuclear protein structured as a seven bladed propeller with unstructured small N- and C-terminal tails (Renault *et al.*, 1998). RCC1 directly interacts with histones H2A/H2B (Nemergut *et al.*, 2001) and the structure of RCC1 bound to Ran and the nucleosomes has been solved: one face of the protein binds to Ran (Renault *et al.*, 2001) whereas binding to chromatin involved the N-terminal tail of the protein as well as loops region in the fourth blade of its β-propeller (England *et al.*, 2010; Makde *et al.*, 2011). RCC1 is modified in cells by removal of the initial N-terminal methionine and mono-, di- or tri-methylation of the new N-terminal residue (serine 2 in human RCC1). This modification is present throughout the cell cycle and is necessary for stable chromatin association and normal mitosis (Chen *et al.*, 2007). The association of RCC1 with chromatin in interphase nuclei and mitotic chromosomes is highly dynamic (Cushman *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2003). The interaction of RCC1 with chromatin is regulated by its interaction with Ran (Hao and Macara, 2008; Zhang *et al.*, 2002). The dynamic of interaction of RCC1 with chromatin is also regulated in a cell cycle dependent manner by various mechanisms including interaction with Ran-GTP-binding protein 1 (RanBP1) (Zhang *et al.*, 2014) and with the phosphoinositide 3-kinase beta (PI3Kβ)(Redondo-Muñoz *et al.*, 2015). A role of phosphorylation of Serine 2 at the N-terminal of RCC1 has also been suggested but remains controversial (Bierbaum and Bastiaens, 2013; Hutchins *et al.*, 2004; Li and Zheng, 2004).

Because of its properties of interaction with the chromatin especially through mitosis during which the interaction is stabilized, RCC1 appears as a good candidate to favour EBNA1's association to chromatin. We have now confirmed the interaction between EBNA1 and RCC1 in various *in vitro* and *ex vivo* models. We have demonstrated that this interaction is direct and characterized precisely the interaction domains involved. Finally, we found that although the proteins colacalized throughout the cell cycle, they only closely interact during

metaphase as was revealed by FRET analysis, strongly suggesting a role of RCC1 in stabilizing the interaction between EBNA1 and the chromatin at this phase of the cell cycle.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture and transfections

HeLa cells and HEK293T cells were grown at 37°C in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and penicillin-streptomycin. Plasmid transfection was performed using either the calcium phosphate precipitate method or the PEI transfection reagent (Polysciences)

Plasmids

pEGFP-N1-EBNA1ΔGA (aa 8 to 641) from which the central Gly-Ala repated region (aa 93 to 325) was removed has been described previously (Jourdan *et al.*, 2012). Unless indicated, all EBNA1 constructions used will be derived from this plasmid and thus contains EBNA1 deprived of the Gly-Ala repeat. pGFP-EBNA1-ΔGR1, pGFP-EBNA1-ΔGR2 and pGFP-EBNA1-ΔGR were generated by site-directed mutagenesis (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene) using oligonucleotides listed in Table 1. pGL2-FR-TK-LUC was generated by subcloning a XhoI-SalI fragment containing the FR region and the Herpes simplex virus thymidine kinase (TK) promoter, from plasmid phEBO-FR-TK-CAT into pGL2basic. For the two-hybrid screen, ORFs for full-length EBNA1, EBNA1 8-410 and EBNA1-381Cter were PCR-amplified (KOD polymerase, Novagen) using the primers listed in Table 1, cloned first in pDONR207 (Invitrogen) then into pGBKT7, using the Gateway recombinational cloning system (Invitrogen) to generate pGBKT7-EBNA1, pGBKT7-EBNA1 8-410, pGBKT7-EBNA1-381Cter. EBNA-1 and deletion mutants cloned into pDEST-Myc, pCI-3xFlag, pDEST15 or pDEST53 were generated in a similar manner as that described above using the Gateway recombinational cloning system (Invitrogen) and primers listed in Table 1. A codon optimised version of EBNA1-ΔGA was cloned into pET22b plasmid (Merck Millipore) to generate pET22b-EBNA1. ORFs for full-length RCC1 (alpha isoform) was transferred from pDONR223-RCC1 (obtained from an ORFeome library) into pDEST-Myc, pCI-3xFlag or pDEST™15 (Invitrogen) using the Gateway recombinational cloning system (Invitrogen) to generate pDEST-Myc RCC1, pCI-3xFlag RCC1 and pDEST15-RCC1. RCC1 N-terminal tail deletion and substitution mutants were generated by Site directed mutagenesis (QuickChange Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene) using oligonucleotides listed in Table 1. pCEP4 EBNA1 mut was generated by inserting stop codon at the beginning of the EBNA1 gene ORF. pEGFP-C1-EBNA1 has been described previously (Jourdan *et al.*, 2012). pRFP-N1-EBNA1, pRFP-C1-EBNA1, pEGFP-N1-RCC1, pEGFP-C1-RCC1, pRFP-N1-RCC1 and pRFP-C1-RCC1 were generated by cloning the relevant PCR-amplified ORFs in pRFP-N1,

pRFP-C1, pEGFP-N1 or pEGFP-C1, using the In-Fusion®HD cloning kit (Clontech) and the oligonucleotides listed in Table 1.

Luciferase Assays

Renilla or Firefly luciferase activities from transfected cells were measured in a Veritas™ Luminometer (Turner Biosystems) using the Renilla or Firefly Luciferase Assay system (Promega Madison Co). Luciferase activity was measured for identical amounts of total protein as evaluated by Bradford assay.

Yeast two-hybrid screens

The screens were made using matings between the AH109 and Y187 yeast strains (Clontech) as previously described (Bazot *et al.*, 2014). Briefly, bait vectors, pGBKT7-EBNA1, pGBKT7-EBNA1 8-410 or pGBKT7-EBNA1-381Cter, were transformed into AH109 (bait strain). A human lymphoblastoid cell line AD-cDNA library (Invitrogen) was transformed into Y187 (prey strain). Single bait strains were mated with prey strain, then diploids were plated on SD-W-L-H + 5 mM 3-AT medium. Positive clones were maintained on this selective medium for 15 days to eliminate any contaminating AD-cDNA plasmid. AD-cDNAs were amplified by colony PCR and inserts were sequenced and identified by automatic BLAST.

Co-immunoprecipitation assays and western blotting analysis

Transfected HEK293T or HeLa cells were harvested from 100 mm dishes 48h post-transfection and lysed in IP buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150-300 mM NaCl, 1 mM Dithiotreitol (DTT) and 0.5% Nonidet P-40) plus protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals). For immunoprecipitation of the transiently expressed Flag-tagged proteins, cell extracts were incubated with 20 µl of anti-Flag M2 affinity gel (Sigma) for 4 h at 4°C and immunopurified proteins were analysed by western blotting. Antibodies used for western blotting analysis were anti-Flag rabbit polyclonal antibody (Sigma), Anti-His6 mouse monoclonal antibody (Roche) and anti-c-Myc (9E10) HRP-conjugated antibody (Santa Cruz Biotechnology, Inc). The appropriate anti-rabbit and anti-mouse horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibody (GE Healthcare) were used as secondary antibody. Bound proteins were analysed by western blotting and western blots revealed using ECL (Pierce).

Production and purification of the 6xhis-EBNA1 protein

The 6xhis-EBNA1 protein was purified from *Escherichia coli* Rosetta (pLysS) strain transformed with pET22b-EBNA1. Cells were lysed in the following buffer (50 mM NaH2PO4, 1 M NaCl, 10 mM Imidazole pH 8) plus protease inhibitors (Roche Molecular Biochemicals) and 1 mg/ml lysozyme. After sonication, the extract was clarified by centrifugation and the protein purified by gravity-flow chromatography using Ni-NTA agarose beads. The beads were washed with the same buffer as above, except for the Imidazole which was increased up to 50 mM, and the proteins eluted in the same buffer containing 150 mM Imidazole.

***In vitro* GST Pull-down assays**

Glutathione S-Transferase (GST) and GST-fusion proteins were purified from *Escherichia coli* BL21 (DE3) codon plus strain extracts, with glutathione-Sepharose 4B beads (GE Healthcare). Beads carrying the GST or the GST-fusion proteins were equilibrated in MTPBS binding buffer (150 mM NaCl, 16 mM Na_2HPO_4, 4 mM NaH_2PO_4, 100 mM EDTA, 1% Triton) in the presence of protease inhibitors (complete EDTA-free cocktail from Roche Molecular Biochemicals) and incubated with either purified 6his-EBNA1 or transfected cell extracts for 4h in MTPBS. Beads were washed 5 times in MTPBS buffer and bound proteins were analysed by western blotting.

EBNA1 peptides arrays and analysis

25mer peptides comprising the entire sequence of EBNA1 (B95.8 strain), with 5 residue shifts (ie. Initiating at residues 1, 6, 11, 16 etc) were synthesized by automatic SPOT synthesis (Kramer and Schneider-Mergener, 1998) directly onto cellulose membranes using Fmoc (9-fluorel methoxycarbonyl) chemistry and Autospot Robot ASS222 peptide synthetizer (Invatis Bioanalytical Instruments AG). Arrays were bathed in ethanol and washed for 10 min in TBST (50 mM Tris.HCl pH7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20), followed by blocking in TBST, 5% (w/v) non-fat milk powder (NFM) for 2 hours at room temperature and washed again with TBST. Arrays were probed with purified GST fusion proteins, at 2 to 5ug/mL in TBST, 1% NFM, shaking overnight at 4°C. Membranes were then washed 3 x 10 min in TBST and incubated with rabbit anti-GST-HRP at 1/10000, shaking overnight at 4°C. Prior to developing with ECL (Pierce #32106) and exposure to film, membrane were washed 3 X 10 times in TBST, RT. To strip the array membranes for re-probing, they were covered in 60 mM Tris-HCl pH6.8, 20 mM DTT, 70 mM SDS, at 70°C for 30 min. The membrane was then washed 2 x 10 min in TBST at RT, briefly blotted dry and rinsed in 100% ethanol ready for re-probing.

Chromatin immunoprecipitations

Chromatin immunoprecipitations (ChIPs) were performed as described by the Upstate protocol. Transfected HEK293T cells were cross-linked with 1% formaldehyde at room temperature for 10 min. Crosslinked chromatin was sonicated using the Bioruptor® from diagenode in order to obtain sheared chromatin yielding fragments of 150 to 500 bp. Sheared chromatin generated from the equivalent of 0.6 x 10^6 cells was used per ChIP. Antibodies used to immunoprecipitate EBNA1 and RCC1 were a goat polyclonal anti-EBNA1 (Ozyme: PA1-7497) and an anti-Flag rabbit polyclonal antibody (Sigma) respectively. Goat IgG (PP40 Millipore) and rabbit IgG (PP64 Millipore) were used respectively as negative control antibodies. Precipitated DNA was assayed by quantitative PCR using FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Molecular Biochemicals) and the amount of

immunoprecipitated chromatin was expressed from duplicate assays as a percentage of the input chromatin. The different primers used are listed in Table 2.

Microscopy

HeLa cells were plated onto glass-bottomed dishes (Ibidi), suitable for confocal microscopy, and transfected with expression vectors coding for EBNA1 and RCC1 proteins fused to either GFP or RFP. Live cells were analyzed with a Zeiss LSM710 confocal microscope with ZEN software. T/PMT. Hoechst counterstaining was performed using Hoechst 33342 (Sigma). GFP and RFP signals were acquired using respectively an argon laser at 488nm and a laser diode (DPSS) at 561nm. Z-stack series were also acquired especially for mitotic cells: the most representative stacks are presented in the figure. All analyses were performed with ImageJ Software.

Förster resonance energy transfer (FRET) analysis

Cells used for FRET acquisition were prepared as for classical microscopy analysis and data collected with an LSM-710 confocal microscope using ZEN software. All the analyses were performed with ImageJ software. FRET analysis was performed using the FRET Analyzer plugin (available at: http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/fret-analyzer/fret-analyzer.htm). Three tracks were used for the acquisition: EGFP (excitation: GFP, reception: GFP range), RFP (excitation: RFP, reception: RFP range) and FRET (excitation: GFP, reception: RFP range). Argon laser and DPSS were used at 2% and 7% power respectively. Gain level was 540 for the GFP signal and 640 or 690 for the RFP signal. In order to calculate the bleedthrough, fluorescent signals were acquired for each track at least 5 times with EGFP or RFP fusion proteins expressed alone in HeLa cells. Spectral leakage for GFP was assessed by the acquisition of EGFP, RFP and FRET signal from cells expressing the EGFP-fusions alone. Spectral leakage for RFP was assessed by the acquisition of EGFP, RFP and FRET from cells expressing the RFP-fusions alone. All control images were acquired using both gain level for the RFP signal, calculated bleedthrough for each gain were applied to the corresponding images acquired with either a gain at 640 or 690. Double transfected cells were used for FRET acquisition data. In each case EGFP, RFP and FRET fluorescent signals were acquired for each track. Imaged cells were selected on the basis of both fusion proteins expression levels being similar to that found in single transfected cells used for bleedthrough calculation. Results of the analysis are presented as three images, considering small, average or high bleedthrough (noted as low, medium or high cut-off) respectively. High cut-off images are the most representative images of the FRET signals. FRET signal is represented as a fire scale (blue=no signal, yellow=max signal).

RESULTS

Deletion of EBNA1 AT-hooks motifs does not affect its interaction with metaphasic chromosomes.

The mechanisms by which EBNA-1 interacts with the mitotic chromosomes are still under debate. One hypothesis is that EBNA1 directly binds to AT-rich regions of the chromosomal DNA via several AT-hook motifs located within the LR1 and LR2 regions (Sears *et al.*, 2004). In addition, it has been shown that fusion proteins between mCherry and various combinations of the EBNA1 regions containing AT-hook motifs, efficiently associate with chromosomes (Kanda *et al.*, 2013). However, the effect of specific deletion of these AT-hook motifs - in the context of the whole protein - on its association with cellular chromosomes has never been tested. We therefore generated derivatives of GFP-EBNA1 with either aa 40 to 64 or 325 to 367 or both regions deleted (GFP-EBNA1 mutant proteins ΔGR1, ΔGR2 or ΔGR respectively) (Fig. 1A) and tested their capacity to bind mitotic chromosomes and activate transcription. Association with chromosomes was analysed by confocal microscopy, following transfection of HeLa cells with the expression plasmids for GFP-EBNA1 or the mutated derivatives. As can be seen in Figure 1B, GFP-EBNA1-ΔGR associates with the metaphasic chromosomes as efficiently as GFP-EBNA1. Similar results were obtained with the -ΔGR1, -ΔGR2 derivatives (data not shown). To test the transactivation ability of the proteins, expression plasmids for each EBNA1 derivative were transfected together with the pGL2-FR-TK-LUC reporter construct (Fig. 1C) into HeLa cells. As can be seen in Figure 1D, GFP-EBNA1 -ΔGR1 and -ΔGR2 derivatives activate LUC expression but not the double mutant, ΔGR. These results thus confirm the previously reported role for the AT-hook motifs in transcriptional activation (Mackey and Sugden, 1999) but demonstrate that their presence is not essential for the targeting of EBNA1 to the mitotic chromosomes.

EBNA1 interacts directly with the cellular factor RCC1

Since the AT-hook motifs appear to be dispensable for the anchoring of EBNA1 to the mitotic chromatin, it is most likely that one or more cellular partners are involved in mediating the association of EBNA1 with the chromosomes. The two cellular proteins which have been previously found to play a role in this process - hEBP2 and HMGB2 - do not appear to be sufficient to account for all the properties of EBNA1 during EBV replication and segregation. In order to identify novel cellular partners of EBNA1, we performed a yeast two-hybrid screen using EBNA1 as bait. From this screen, we identified Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) (gene ID: 1104) as a putative cellular partner for EBNA1. RCC1 is a guanine-nucleotide releasing factor that promotes exchange of Ran-bound GDP by GTP. RCC1 plays a key role both in nucleo-cytoplasmic transport and in the regulation of the onset of chromosome condensation in the S phase (review in (Hadjebi *et al.*, 2008).

We first confirmed - by co-immunoprecipitation in human cells - the interaction between EBNA1 and RCC1. For this, we transfected HeLa cells with a Flag-tagged EBNA1 expression plasmid, either alone, or together with an expression vector for Myc-tagged RCC1. As can be seen in Figure 2A, Myc-RCC1 was specifically co-immunoprecipitated with Flag-EBNA1 (left panels). In a reverse experiment (right panels), we transfected the cells with a Myc-tagged EBNA1 expression plasmid, either alone, or together with an expression vector for Flag-tagged RCC1 and found that Myc-EBNA1 was specifically co-immunoprecipitated with Flag-RCC1.

To assess if the interaction is direct, we performed an *in vitro* GST-pulldown assay using both GST-RCC1 and 6xhis-EBNA1 proteins produced in bacteria and purified. 6xhis-EBNA1 was incubated with similar amounts of GST or GST-RCC1 proteins bound to glutathione sepharose beads. As illustrated in Figure 1B, EBNA1 is efficiently retained on GST-RCC1 but not on GST alone which strongly suggests a direct interaction between EBNA1 and RCC1.

EBNA1 binds RCC1 via domains previously reported to be essential for chromosome binding of the protein

EBNA1 interaction with the mitotic chromosomes is dependent on the so-called Linking regions 1 and 2 (LR1 and LR2) (Fig. 3). We thus first investigated the implication of these regions in the interaction with RCC1. For this, we expressed a series of GFP-tagged EBNA1 deletion mutants in HeLa cells and incubated the lysates with GST-RCC1-bound beads. As can be seen in Figure 3B, deletion mutants containing either LR1, LR2 or both are all able to interact with RCC1, whereas EBNA1 mutant 377-Cter only faintly interacts with RCC1. This preferential interaction of RCC1 with the LR domains of EBNA1, thus supports a putative role for RCC1 in EBNA1's targeting to the metaphase chromosomes. Surprisingly however, deletion of the region comprised between aa 325 to 376 - which was previously found to be deleterious for *oriP* plasmid maintenance and mitotic localization (Shire *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000)- is sufficient to completely abrogate the interaction with RCC1, even though the LR1 domain is still present in this mutant, suggesting that this deletion affects the general organisation of the protein (Fig 3C). In accordance with this results, the double deletion mutant (EBNA1 ΔGR) does not interact with RCC1 either (Fig. 3D).

The RCC1 N-terminal tail is essential for RCC1 interaction with EBNA1

We next wanted to map the RCC1 domain(s) interacting with EBNA1. However, RCC1 is composed of small N-terminal and C-terminal unstructured tails surrounding a seven-bladed propeller structure (Makde *et al.*, 2011) (Figure 4A). Because of the highly structured central domain of the protein, introducing large mutations in this region was not possible. We thus generated a single RCC1 mutant, RCC1 Δ1-20, with its N-terminal tail deleted. Moreover, we cloned the N-terminal tail of RCC1 - which is known to be involved in many protein-protein

interactions - in fusion with GST. We then performed GST-pulldown assays using transfected HeLa cell extracts. Interestingly, we found that EBNA1 interacts specifically with the N-terminal tail of RCC1 but not with the rest of the protein, at least in this assay (Fig. 2B, upper panels). To further map the interaction region we introduced smaller deletions within the N-terminal extremity of RCC1. As can be seen in Figure 4B (lower panels), deletion of aa 15 to 20 does not modify the interaction with EBNA1, whereas deletion of aa 1 to 5 completely abolishes the interaction (Fig 2B-lower panel). We then introduced punctual mutations in this small region and tested the interaction of these mutants with EBNA1 (Figure 4C). Substitution of the proline and the lysine residues at positions 2 and 3 by alanines is sufficient to completely abolish the interaction with EBNA1, whereas substitution of the lysine and arginine residues at positions 4 and 5 has no effect (upper panels). Substitution of either the proline at position 2 or the lysine at position 3 by alanine, led to a diminution of the interaction. Taken together, these results suggest that these amino acids are both crucial for the interaction of RCC1 with EBNA1.

Peptide array analysis defines supplementary RCC1 interaction regions in addition to the LR1 and LR2 domains

With the aim to delimit the domains of EBNA1 involved in the interaction with RCC1 more precisely, we used peptide array analysis. A library of overlapping peptides (25-mers), each shifted by 5 amino acids across the entire sequence of EBNA1 - including the GA repeat (Gar) - was immobilised on cellulose membranes and probed with recombinant GST-RCC1 (Fig. 5A, panel a). Probing the EBNA1 peptide array with full length GST-RCC1 showed strong binding to peptides covering regions between aa G11-G35, S21-S45, G306-R435, G371-G410, R396-E435 and T596-E641. Intermediate binding was also seen for peptides covering regions between aa S26-A105, G326-S390, S391-F415, E416-D440, P431-A490, R521-P545 and C531-F415. A schematic summary of the results (Fig. 5B) shows that the binding regions encompass the first Gly/Arg repeat of EBNA1 (GR1, residues 33 to 53) up to the start of the Gar and the start of the GR2 including a small part of the GAr, which conforms with our GST-pulldown mapping of the interaction. Moreover, this peptide analysis also revealed the presence of binding regions in the C-terminal moiety of EBNA1: a first region, between aa G371-R451, covers the serine-rich region - S_{386}QSSSSGSPP - which forms the putative core binding site for CK2, the known USP7 binding site (Q436 to R451) and the beginning of the DNA binding and dimerization domain of EBNA1; a second region incorporates the C-terminal tail of the protein, rich in the negatively charged residues aspartic acid and glutamic acid. In order to assess if GST contributed to any of the binding activity, the array was re-probed with purified GST (Fig. 5A, panel d). Only very weak binding was detected for peptides R396-E420 and E411-E435, indicating that the binding observed for GST-RCC1 was mediated by RCC1.

In order to explore the contribution of the first 20 N-terminal residues of RCC1 to binding EBNA1 peptides, a second array was probed with purified GST-RCC1 Δ1-20 (Fig 5A, panel b). Weak binding was observed for largely the same set of peptides as for full length RCC1, with the notable exception of the C-terminal tail peptides, which show no binding, even on long exposure of the array blot. Two peptides showed moderate to strong binding: peptide G81-A105 which spans the start of the Gar, and peptide F306-P430, one of the peptides noted for strong binding by the full-length RCC1 protein. Therefore, most of the binding to EBNA1 peptides observed with full-length RCC1 can be attributed to the first 20 residues. This suggests that either this N-terminal region of RCC1 is the primary domain binding to EBNA1, or that it is required for correct folding of full-length protein to enable binding to EBNA1.

To extend this observation and distinguish between these two possibilities, the second array was stripped and re-probed with just the N-terminal region of RCC1, residues 1-20, again fused to GST (Fig. 5A, panel c). GST-RCC1 1-20 showed relatively weak binding to most peptides and intermediary binding to the C-terminal tail peptides. However, it showed strong binding to peptides covering region R396 to E435. As noted above, this region lies between the known binding sites for CK2 and USP7 and is well conserved in EBV EBNA1 isolates (although not in the EBNA1 homologs of related LCVs) (Hussain *et al.*, 2014). Thus, in comparison to the binding to EBNA1 peptides observed for the full-length RCC1, the binding to peptides covering R396 to E435 and the C-terminal tails appears to be mediated primarily by RCC1 1-20. The strong binding of full-length RCC1 for the other regions was weak for both of the RCC1 truncation proteins, suggesting that residues 1-20 of RCC1 contribute to the conformation of RCC1 to mediate the full interaction.

The N-terminal region of RCC1 (MSPKRIAKRRSPPADAIPKS) contains 6 positively charged residues and one negatively charged residue. The C-terminal tail of EBNA1, from residue 610 to 641 has 14 negatively charged residues, interspersed with glycines and no positively charged residues. It is therefore possible that the interaction of this peptide to EBNA1 C-terminal peptides is largely charge-based. The stretch of residues in common between EBNA1 peptides interacting strongly with both RCC1 and RCC1 1-20, lies between aa 411 to 420 (EADYFEYHQE). This region contains 4 negatively-charged residues but, within the various peptides containing this region, is surrounded by residues of negative and positive charges. However, RCC1 1-20 binds more strongly to this region than the C-terminal tail peptides, suggesting that overall charge alone does not account for the binding and that peptide form or spacing of the charged residues may be important. This region is therefore a good candidate for a core binding site between the N-terminal of RCC1 and EBNA1.

RCC1 1-20 interacts with the core domain through electrostatic interaction

To determine the key residues in the candidate core binding site spanning the EBNA1 sequence from residue 401 to 430, a new array was generated with a series of mutated peptides including: sequential Ala replacement peptides (Ala scanning); N- and C-terminal deletion peptides; ala replacement of the four negatively-charged residues of the core region; and the core region alone (all peptides used are listed in Figure 6). This array was probed with GST-RCC1 1-20 (Fig. 6). Sequential replacement of residues with ala showed no (or little) reduction in binding until residue 413 (peptide 16). Ala replacement of DYFEY and Q of the core all showed substantial reduction in binding by GST-RCC1 1-20, with replacement of F_{415} showing the weakest binding with these punctual replacements (peptides 16 to 20 and 22). Further Ala replacement to residue 430 (peptides 23 to 33) showed no reduction in binding, confirming the span of the core binding region . Replacement of the four charged residues (E_{411}, D_{413}, E_{416}, E_{420}) in the core completely abrogated binding (peptide 34), while binding to the 10 residue core alone (peptides 63 and 64) was as strong as binding to the full-length 25mer peptides incorporating this core. Sequential N-terminal deletion of the 25mer peptide revealed reduced binding upon Y_{414} of the core and no binding with further N-terminal deletion, again revealing F_{415} to be a critical residue in binding (peptides 43 to 48). It is noteworthy that this 15mer deleted up to F_{415} still has 3 glutamate (negative) residues, but does not bind GST-RCC1 1-20. Sequential C-terminal deletion of the 25mer peptide (peptides 59 to 62) revealed reduced binding upon deletion of E_{420}, confirming the C-terminal limit of the core region. These data indicate that residues 413 to 420 (DYFEYHQE) of EBNA1 represent a core binding region of the first 20 residues of RCC1, that the negatively charged residues in this region are essential for the interaction, and that F_{415} and Y_{414} are key in the interaction.

To explore if the complete protein behaved similarly, the same array was probed with full-length GST-RCC1. Similar, but not identical results were obtained with GST-RCC1 with the ala replacement of DYFEY and Q of the core showing less reduction in binding compared to RCC1 1-20. Nevertheless, binding was lost with sequential N-terminal deletion, showing significant reduction upon deletion of F_{415}, and complete loss of binding upon deletion of E_{416}. As with RCC1 1-20, replacement of the four charged residues in the core completely abrogated binding, reinforcing the importance of these residues in RCC1 binding to this region (data not shown).

EBNA1 recruits RCC1 on the FR region of EBV *oriP*.

EBNA1 simultaneously associates with the FR element of *oriP* on the viral episome and cellular chromosomes during mitosis. To assess the ability of EBNA1 to recruit RCC1 on *oriP*, we performed ChIP assays. For this we used a derivative of pCEP4 - a self-replicating plasmid carrying the EBV *oriP* and the EBNA1 ORF - in which EBNA1 has been inactivated by the introduction of a stop codon at the beginning of the EBNA1 ORF. This pCEP4 derivative was

transfected into HEK293T cells, together with expression vectors for Flag-RCC1, Myc-EBNA1ΔGA or both. ChIP was performed using either anti-EBNA1 or anti-Flag antibodies and immunoprecipitated DNA was analysed by qPCR using a series of primers targeting the *oriP* region (Figure 8A and Table 2). As illustrated in Figure 8B, EBNA1-immunoprecipitated DNA is enriched around *oriP* regions FR and DS. The enrichment observed in the case of the assay performed in the absence of transfected EBNA1 expression plasmid, is likely due to the binding of a truncated form of EBNA1 expressed from pCEP4 via the use of a downstream ATG. Interestingly, RCC1-immunoprecipated DNA was enriched on the FR region - but not on DS - strongly suggesting that EBNA1 recruits RCC1 on the *oriP* when bound on FR (Figure 8C). These results support a role for RCC1 during EBV episome segregation.

EBNA1 interacts with RCC1 on chromatin during mitosis

In order to study the subcellular localization of the two proteins in living cells, several EGFP- and RFP-tagged forms of EBNA1 and RCC1 were expressed in HeLa cells and observed by live cell imaging during interphase and mitosis. As illustrated in Figure 8, the EGFP-RCC1 and EBNA1-RFP proteins colocalized almost perfectly in living cells during interphase and throughout mitosis. Similar observations were made in cells coexpressing other couples of EGFP- and RFP-tagged forms of the proteins (data not shown). During interphase the proteins colocalized throughout the nucleoplasm - with the exception of the nucleolus from which RCC1 is completely excluded and only weak staining is observed for EBNA1. During prophase and metaphase, both EBNA1 and RCC1 are specifically associated with the mitotic chromosomes.

To confirm that EBNA1 effectively interacts with RCC1 in living cells we performed a Förster resonance energy transfer (FRET) analysis. FRET is a nonradioactive energy transfer that can occur when a donor and a compatible acceptor fluophore are located at a distance less than 10 nm from each other. FRET efficiency relies on the relative position and distance of the donor and acceptor fluorophores, even when fusion proteins are in close interaction. We thus started to test the two following pairs of fusion proteins: EGFP-RCC1/EBNA1-RFP and EGFP-EBNA1/RFP-RCC1. We did not observe any significant FRET with the EGFP-RCC1/EBNA1-RFP pair. However, when we used the EGFP-EBNA1/RFP-RCC1 pair we found that the two proteins efficiently interact both during interphase and metaphase (Fig. 10). During interphase, it is interesting to note that, although both proteins are present throughout the nucleoplasm - as could be seen in our colocalisation analysis - they were only in close interaction at the periphery of the nucleus. We observed only very weak interaction during prophase. By contrast, we observed strong interaction between the two proteins on the metaphasic chromosomes. Taken together, these results suggest that the interaction between RCC1 and EBNA1 is highly dynamic throughout the cell cycle. The strong FRET

signal observed specifically on the metaphasic chromosomes supports a role for RCC1 in stabilising EBNA-1 interaction with the chromosomes during mitosis.

DISCUSSION

The mechanisms by which EBNA1 tethers the EBV genome to the mitotic chromosomes are far from being understood. The AT-hook regions of the protein have been proposed to play a major role in EBNA1 chromosome binding activity and episome maintenance (Sears *et al.*, 2003, 2004). Such a role for these AT-hook regions has recently been comforted by the use of netropsin, a small molecule that binds to the minor groove of AT-rich DNA. Treatment by netropsin leads to a loss of EBV genomes both from epithelial and lymphoid cells, suggesting an essential role for the AT-rich DNA binding activity of these regions in EBV plasmid maintenance (Chakravorty and Sugden, 2015). However, we have found that deletion of both EBNA1 AT-hook regions does not affect EBNA1's general targeting to the metaphasic chromosomes. This latter result is compatible with the characterization by Marechal et al (Marechal *et al.*, 1999) of 3 independent CBS regions. In effect, specific deletion of the AT-hook domains leaves CBS1 (aa 72 to 84) intact. These data, thus reinforce the idea of alternative mechanisms of recruitment of EBNA1 to the metaphasic chromosomes, possibly via the interaction with cellular chromatin binding factors.

Here, we have identified RCC1 as a novel mediator of EBNA1 tethering to the metaphasic chromosomes. RCC1 interacts with the chromatin throughout the cell cycle in a highly dynamic manner and this interaction is stabilised during mitosis. Therefore, RCC1 possesses all the properties required to serve as a chromatin anchor for EBNA1, especially during mitosis. We have now characterized the interaction between EBNA1 and RCC1 by various biochemical methods such as co-immunoprecipitation and GST-pull down. Importantly, by performing an *in vitro* assay using both proteins purified from bacteria, we have demonstrated that the two proteins can interact directly.

Then, in a first approach to characterize the proteins' interaction domains we have used a GST-pull down assay. This assay has allowed us to demonstrate that the RCC1 interaction domains in EBNA1 are localized within the LR1 and LR2 regions of the protein, previously found to be important for tethering EBNA1 to the chromosomes. In effect, both regions LR1 and LR2 - fused to EGFP - are known to independently mediate binding of the fusion proteins to mitotic chromosomes in live cells. Accordingly, we have found that both regions can also interact independently with RCC1. Surprisingly, however, deletion of the LR2 region (mutant Δ325-376) - which has been previously shown to impair hEBP2 interaction as well as *oriP* plasmid maintenance and mitotic localization (Shire *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2000) - completely abolishes EBNA1 interaction with RCC1. This latter result is not in coherence with the finding that the LR1 region - which is still present in this mutant - is sufficient alone to

mediate the interaction with RCC1: these results suggest that the conformation or accessibility of the LR1 region is strongly compromised by this deletion, affecting various functions of the protein without a direct involvement of the deleted region.

As mentioned above, in the first part of this study, we tested the capacity of an EBNA1 mutant with its two AT-hook domains specifically deleted, to localize to the cellular chromosomes during mitosis. This mutant - which had never been tested before - appears to localize normally to the chromatin both during interphase and through mitosis, suggesting that mechanisms other than the interaction of EBNA1 with AT-rich regions of DNA are involved - such as the interaction with the new EBNA1 cellular partner, RCC1. However, we have found that deletion of the two AT-hook domains also affects the interaction with RCC1, suggesting that still other proteins are involved. Another chromatin binding factor, HMGB2, was previously identified as an EBNA1 interacting factor (Jourdan *et al.*, 2012). HMGB2 could thus be responsible for targeting EBNA1 to the chromatin, in the absence of both direct interaction with DNA - via the AT-hooks - and interaction with RCC1. To corroborate such an hypothesis it would be interesting to know more precisely where HMGB2 binds within the N-terminal part of EBNA1. Alternatively, another as yet not identified protein could be involved in the process.

Concomitant with these experiments, we have also investigated which domain of RCC1 is involved in the interaction with EBNA1. Our results identify the N-terminal flexible region of RCC1 as an essential interaction domain for EBNA1. Moreover, this N-terminal 20 aa domain is sufficient, when fused to GST, to mediate interaction with EBNA1. In this domain, mutation of the serine and proline residues at positions 2 and 3 completely abolishes the interaction with EBNA1. Interestingly, the N-terminal tail of RCC1, and in particular the serine at position 2, is the site of post-transcriptional modification - both α-N-methylation and phosphorylation - that is important for stable chromatin association and regulation of RCC1's NLS interaction with importins α and β (Chen *et al.*, 2007; Li and Zheng, 2004). Whether the post-transcriptional modifications on serine 2 are important for interaction with RCC1 is however not likely since the interaction between RCC1 and EBNA1 could be visualised using both proteins produced in bacteria - in which such modifications are not possible. However, it is not excluded that such modifications within mammalian cells could modulate the interaction between the two proteins. Conversely, since these modifications are known to play an important role in stabilising RCC1 on the chromatin, EBNA1's interaction with these regions could affect the dynamics of RCC1's interaction with chromatin.

Our subsequent use of EBNA1 peptide arrays allowed us to define more precisely the EBNA1 interaction regions of not only RCC1 as a whole, but also the N-terminal tail. Using full-length RCC1, we first confirmed the interaction of the protein with the LR1 and LR2 regions of EBNA1, but then also identified two other regions of EBNA1 that are involved in

the interaction: the C-terminal tail, and a region located between the previously characterized CK2 and USP7 binding sites. Interestingly, these two regions - mostly the latter - are those that are recognised by RCC1's N-terminal tail. In accordance with our GST-pulldown results, we found that interaction of N-terminal tail deleted RCC1 with the various EBNA1 peptides is drastically altered. Our results suggest that the N-terminal tail of RCC1, required for the interaction, specifically contacts a core region of EBNA1 - DYFEYHQE - located between aa 413 and 420 of EBNA1. When set in the context of an *in silico* structural model of full-length EBNA1 (Hussain *et al.*, 2014), the core domain appears to be located in a region that resembles a small pocket. This could potentially accommodate the N-terminal region of RCC1, allowing further interactions between the LR1 and LR2 domains of EBNA1 and the seven-propeller helix of RCC1, and hence stabilisation of the interaction between the two proteins.

Whether the interaction of RCC1 with EBNA1 is compatible with the association of RCC1 with the chromatin is of course a crucial question. The structures of RCC1 in complex with both Ran and the nucleosome have been solved (England *et al.*, 2010)(Makde *et al.*, 2011). RCC1 interacts with the histone H2A-H2B dimer surface of the nucleosome core particle and nucleosomal DNA, via loops in the fourth blade of its β-propeller. In this configuration, the N-terminal tail is positioned for further interactions with nucleosomal DNA. Moreover, although the N-terminal tail is not visible in the crystal, the authors found that use of an RCC1 mutant with an aa 2-23 deletion gave a stable crystal, whereas an RCC1 mutant with an aa 2-29 deletion did not, suggesting that residues 24-28 are necessary for interaction with the nucleosome (Makde *et al.*, 2011). Since EBNA1 appears to interact within the extreme N-terminal of the protein (residues 1 to 5) this is compatible with an interaction of RCC1 with the nucleosome. Furthermore, from the structural data, the N-terminal tail of RCC1 appears to be oriented on the side of the RCC1 β-propeller opposite to that which interacts with Ran, suggesting that EBNA1's interaction does not interfere with the Ran interaction. This hypothesis is comforted by co-immunoprecipitation data showing that Ran co-immunoprecipitates with EBNA1 in a RCC1-dependent manner (data not shown) indicating that the tri complex Ran-RCC1-EBNA1 is stable.

Following the biochemical characterization of the interaction between EBNA1 and RCC1, we analysed the dynamics of interaction between the two proteins in live cells. In particular, FRET analysis allowed us to confirm a direct interaction of EBNA1 and RCC1 on metaphasic chromosomes. Moreover, the combination of our colocalization experiments in live cells and FRET analysis allowed us to document more precisely the dynamics of interaction between the two proteins throughout the cell cycle. Colocalization experiments demonstrated a perfect colocalization of the two proteins and chromatin throughout the cell cycle. However, the proximity of the two proteins -as determined by FRET analysis - varies

according to the location within the cell nucleus as well as the phase of the cell cycle: during interphase, although the two proteins appear to be colocalizing throughout the cell nucleus, FRET could only be observed at the periphery of the nucleus, suggesting that close interaction between EBNA1 and RCC1 could be linked to the latter being in a different conformation when actively involved in nucleo-cytoplasmic transport activity. This result opens up the possibility that the interaction of EBNA1 with RCC1 could facilitate functions other than segregation of the viral episome. One possible role could be in apoptosis regulation. In effect, It has been shown that in the early stages of apoptosis - induced by etoposide treatment - RanGTP level is diminished, which correlates with an immobilization of RCC1 on the chromosomes. This immobilization of RCC1 is due to the phosphorylation of H2B (at position S14) which regulates chromosomal condensation during apoptosis. Mst1 is the kinase responsible for H2BS14 phosphorylation: Mst1 shuttles due to an NES at its C-terminal and, in normal conditions, is constantly exported to the cytoplasm. In conditions of apoptosis, this NES is cleaved by caspase 9, and Mst1 remains in the nucleus where it can phosphorylate H2S14. The consequences of all this is collapsing of the RanGTP gradient and failure to import NLS-containing proteins (Wong *et al.*, 2009). Interestingly, a role for EBNA1 in the inhibition of apoptosis - involving various mechanisms - has been previously reported (Saridakis *et al.*, 2005 ; Sivachandran *et al.*, 2010 ; Frappier, 2011). By interacting with RCC1, EBNA1 could interfere with the immobilization of RCC1 and restore, at least partially, the RanGTP gradient, thus contributing to apoptosis inhibition.

Most importantly, during mitosis, FRET was specifically observed in metaphase, but not in prophase, indicating a more specific role for RCC1 at this particular stage of mitosis that precedes segregation of sister chromatids. This observation, together with the good correlation between EBNA1 domains previously characterized for their role in chromosome binding and episome maintenance, and the RCC1 interaction domains, argue for an important role of RCC1 in EBV episome tethering to the chromosomes and the subsequent episome maintenance. However, this role for RCC1 in episome maintenance will be difficult to prove directly since RCC1 is an essential protein whose downregulation leads to premature chromosome condensation or arrest in the G1 phase of the cell cycle (Uchida *et al.*, 1990).

Clearly, EBNA1 tethering to the chromatin throughout the cell cycle plays an essential role from viral episome replication to efficient segregation during mitosis, and the mechanisms are very complex. It is also probable that several cellular proteins are involved, each playing a role at different stages of the cell cycle to bring EBNA1 to the chromatin: hEBP2, the first EBNA1 cellular partner to be characterized has been recently found to be associated with EBNA1 during interphase (Jourdan *et al.*, 2012); HMGB2 on the other hand has been found to be associated with EBNA1 on the chromatin both during interphase and mitosis (Jourdan *et al.*, 2012); RCC1 colocalises with EBNA1 throughout the cell cycle but the

interaction appears to be specifically stabilized during metaphase; Lastly, interaction between EBNA1 and the chromosomes could be stabilized during mitosis by a direct interaction of the EBNA1 AT-hook domains with nucleosomal DNA.

Finally, it is interesting to note that the ortholog of EBNA1 in KSHV (Kaposi Sarcoma Herpes Virus), LANA (Latency-Associated Nuclear antigen), directly interacts with H2A-H2B dimers to enable its binding to chromosomes. This interaction is mediated by a small region of LANA (aa 5 to 13) located in the N-terminal of the protein. The resolution of the crystal structure of the nucleosome complexed with the first 23 amino acids of LANA revealed that the LANA peptide forms a hairpin that interacts with an acidic H2A-H2B region implicated in the formation of higher order chromatin structure (Barbera *et al.*, 2006). Interestingly, RCC1 targets the same region of the nucleosomal H2A-H2B dimer as LANA, and the two proteins have been shown to compete for nucleosome interaction (England *et al.*, 2010). Thus, whereas LANA directly contacts the H2A-H2B dimer to enable its binding to the chromosomes, EBNA1 appears to interact indirectly with the same H2-H2B through RCC1, a protein that binds H2A-H2B on the same region as LANA. Similar to EBNA1, LANA also interacts with several cellular proteins that appear to play a role in the tethering of LANA to chromosomes and/or episome segregation, such as the chromatin-associated factors MeCP2, DEK (Krithivas *et al.*, 2002) and the kinetochore-associated proteins Bub1 and Cenp-F (Xiao *et al.*, 2010). Thus EBNA1 and LANA have evolved similar but not identical mechanisms to insure anchorage of the viral episomes onto the chromatin at different stages of the cell cycle, thus allowing efficient replication and segregation of the respective viral episomes.

FUNDING

This work was supported by the 'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale' (INSERM); 'the Cluster de Recherche Rhône-Alpes en Infectiologie'; 'the Ligue Contre le Cancer, comité du Rhône'; and the 'Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC grant n° R11176CC)'. T. D. has been recipient of a fellowship from the 'Ministère de l'enseignement et de la Recherche scientifique (MENRS) and of the "Ligue Nationale Contre le Cancer". Q. B. has been recipient of fellowships from the 'Ministère de la Recherche et de la Technologie' (MRT) and of the 'Association pour la Recherche contre le Cancer' (ARC).

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the contribution of the AniRA Genetic Analysis and cytometry platforms and the "Platim" microscope facilities of the SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (US8/UMS3444). Finally, the authors thank Dr R. Buckland for reading the manuscript.

REFERENCES

Adams, A. (1987). Replication of latent Epstein-Barr virus genomes in Raji cells. J. Virol. *61*, 1743–1746.

Ambinder, R.F., Shah, W.A., Rawlins, D.R., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1990). Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-Barr virus DNA. J. Virol. *64*, 2369–2379.

Ambinder, R.F., Mullen, M.A., Chang, Y.N., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1991). Functional domains of Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1. J. Virol. *65*, 1466–1478.

Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E., and Mattaj, I.W. (2002). Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living Caenorhabditis elegans embryos. Mol. Biol. Cell *13*, 4355–4370.

Bamba, C., Bobinnec, Y., Fukuda, M., and Nishida, E. (2002). The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo. Curr. Biol. CB *12*, 503–507.

Bazot, Q., Deschamps, T., Tafforeau, L., Siouda, M., Leblanc, P., Harth-Hertle, M.L., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Kempkes, B., Tommasino, M., *et al.* (2014). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A protein regulates CDKN2B transcription via interaction with MIZ-1. Nucleic Acids Res. *42*, 9700–9716.

Bierbaum, M., and Bastiaens, P.I.H. (2013). Cell cycle-dependent binding modes of the ran exchange factor RCC1 to chromatin. Biophys. J. *104*, 1642–1651.

Bochkarev, A., Barwell, J.A., Pfuetzner, R.A., Bochkareva, E., Frappier, L., and Edwards, A.M. (1996). Crystal structure of the DNA-binding domain of the Epstein-Barr virus origin-binding protein, EBNA1, bound to DNA. Cell *84*, 791–800.

Cai, X., Schafer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., and Cullen, B.R. (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. PLoS Pathog *2*, e23.

Chakravorty, A., and Sugden, B. (2015). The AT-hook DNA binding ability of the Epstein Barr virus EBNA1 protein is necessary for the maintenance of viral genomes in latently infected cells. Virology *484*, 251–258.

Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A., and Yates, J.L. (2001). Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 10085–10089.

Chen, T., Muratore, T.L., Schaner-Tooley, C.E., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Macara, I.G. (2007). N-terminal alpha-methylation of RCC1 is necessary for stable chromatin association and normal mitosis. Nat Cell Biol *9*, 596–603.

Crawford, D.H. (2001). Biology and disease associations of Epstein-Barr virus. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci *356*, 461–473.

Cushman, I., Stenoien, D., and Moore, M.S. (2004). The dynamic association of RCC1 with chromatin is modulated by Ran-dependent nuclear transport. Mol. Biol. Cell *15*, 245–255.

England, J.R., Huang, J., Jennings, M.J., Makde, R.D., and Tan, S. (2010). RCC1 uses a conformationally diverse loop region to interact with the nucleosome: a model for the RCC1-nucleosome complex. J Mol Biol *398*, 518–529.

Frappier, L. (2011). Viral disruption of promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies by hijacking host PML regulators. Virulence *2*, 58–62.

Frappier, L., and O'Donnell, M. (1991). Overproduction, purification, and characterization of EBNA1, the origin binding protein of Epstein-Barr virus. J. Biol. Chem. *266*, 7819–7826.

Hadjebi, O., Casas-Terradellas, E., Garcia-Gonzalo, F.R., and Rosa, J.L. (2008). The RCC1 superfamily: from genes, to function, to disease. Biochim Biophys Acta *1783*, 1467–1479.

Hao, Y., and Macara, I.G. (2008). Regulation of chromatin binding by a conformational switch in the tail of the Ran exchange factor RCC1. J Cell Biol *182*, 827–836.

Hodin, T.L., Najrana, T., and Yates, J.L. (2013). Efficient replication of Epstein-Barr virus-derived plasmids requires tethering by EBNA1 to host chromosomes. J. Virol. *87*, 13020–13028.

Hussain, M., Gatherer, D., and Wilson, J.B. (2014). Modelling the structure of full-length Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. Virus Genes *49*, 358–372.

Hutchins, J.R.A., Moore, W.J., Hood, F.E., Wilson, J.S.J., Andrews, P.D., Swedlow, J.R., and Clarke, P.R. (2004). Phosphorylation regulates the dynamic interaction of RCC1 with chromosomes during mitosis. Curr. Biol. CB *14*, 1099–1104.

Jones, C.H., Hayward, S.D., and Rawlins, D.R. (1989). Interaction of the lymphocyte-derived Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 with its DNA-binding sites. J. Virol. *63*, 101–110.

Jourdan, N., Jobart-Malfait, A., Dos Reis, G., Quignon, F., Piolot, T., Klein, C., Tramier, M., Coppey-Moisan, M., and Marechal, V. (2012). Live-cell imaging reveals multiple interactions between Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 and cellular chromatin during interphase and mitosis. J. Virol. *86*, 5314–5329.

Kanda, T., Otter, M., and Wahl, G.M. (2001). Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in epstein-barr virus-based plasmids. Mol. Cell. Biol. *21*, 3576–3588.

Kanda, T., Horikoshi, N., Murata, T., Kawashima, D., Sugimoto, A., Narita, Y., Kurumizaka, H., and Tsurumi, T. (2013). Interaction between basic residues of Epstein-Barr virus EBNA1 protein and cellular chromatin mediates viral plasmid maintenance. J. Biol. Chem. *288*, 24189–24199.

Kapoor, P., and Frappier, L. (2003). EBNA1 partitions Epstein-Barr virus plasmids in yeast cells by attaching to human EBNA1-binding protein 2 on mitotic chromosomes. J Virol *77*, 6946–6956.

Kapoor, P., Shire, K., and Frappier, L. (2001). Reconstitution of Epstein-Barr virus-based plasmid partitioning in budding yeast. EMBO J *20*, 222–230.

Kapoor, P., Lavoie, B.D., and Frappier, L. (2005). EBP2 plays a key role in Epstein-Barr virus mitotic segregation and is regulated by aurora family kinases. Mol. Cell. Biol. *25*, 4934–4945.

Kieff, E., and Rickinson, A.B. (2007). Epstein Barr virus and its replication. In Fields Virology, D.M. Knipe, ed. (Wolters Kluwer/ Lippincott Williams &Wilkins), pp. 2063–2654.

Kirchmaier, A.L., and Sugden, B. (1995). Plasmid maintenance of derivatives of oriP of Epstein-Barr virus. J. Virol. *69*, 1280–1283.

Krithivas, A., Fujimuro, M., Weidner, M., Young, D.B., and Hayward, S.D. (2002). Protein interactions targeting the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus to cell chromosomes. J. Virol. *76*, 11596–11604.

Li, H.Y., and Zheng, Y. (2004). Phosphorylation of RCC1 in mitosis is essential for producing a high RanGTP concentration on chromosomes and for spindle assembly in mammalian cells. Genes Dev *18*, 512–527.

Li, H.Y., Wirtz, D., and Zheng, Y. (2003). A mechanism of coupling RCC1 mobility to RanGTP production on the chromatin in vivo. J Cell Biol *160*, 635–644.

Little, R.D., and Schildkraut, C.L. (1995). Initiation of latent DNA replication in the Epstein-Barr virus genome can occur at sites other than the genetically defined origin. Mol. Cell. Biol. *15*, 2893–2903.

Mackey, D., and Sugden, B. (1999). The linking regions of EBNA1 are essential for its support of replication and transcription. Mol. Cell. Biol. *19*, 3349–3359.

Mackey, D., Middleton, T., and Sugden, B. (1995). Multiple regions within EBNA1 can link DNAs. J Virol *69*, 6199–6208.

Makde, R.D., England, J.R., Yennawar, H.P., and Tan, S. (2011). Structure of RCC1 chromatin factor bound to the nucleosome core particle. Nature *467*, 562–566.

Marechal, V., Dehee, A., Chikhi-Brachet, R., Piolot, T., Coppey-Moisan, M., and Nicolas, J.C. (1999). Mapping EBNA-1 domains involved in binding to metaphase chromosomes. J Virol *73*, 4385–4392.

Nanbo, A., Sugden, A., and Sugden, B. (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. EMBO J. *26*, 4252–4262.

Nayyar, V.K., Shire, K., and Frappier, L. (2009). Mitotic chromosome interactions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) and human EBNA1-binding protein 2 (EBP2). J Cell Sci *122*, 4341–4350.

Nemergut, M.E., Mizzen, C.A., Stukenberg, T., Allis, C.D., and Macara, I.G. (2001). Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. Science *292*, 1540–1543.

Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D., and Hayward, G.S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. Cell *42*, 859–868.

Redondo-Muñoz, J., Pérez-García, V., Rodríguez, M.J., Valpuesta, J.M., and Carrera, A.C. (2015). Phosphoinositide 3-kinase beta protects nuclear envelope integrity by controlling RCC1 localization and Ran activity. Mol. Cell. Biol. *35*, 249–263.

Reisman, D., Yates, J., and Sugden, B. (1985). A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. Mol. Cell. Biol. *5*, 1822–1832.

Renault, L., Nassar, N., Vetter, I., Becker, J., Klebe, C., Roth, M., and Wittinghofer, A. (1998). The 1.7 A crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. Nature *392*, 97–101.

Renault, L., Kuhlmann, J., Henkel, A., and Wittinghofer, A. (2001). Structural basis for guanine nucleotide exchange on Ran by the regulator of chromosome condensation (RCC1). Cell *105*, 245–255.

Riddick, G., and Macara, I.G. (2005). A systems analysis of importin-{alpha}-{beta} mediated nuclear protein import. J. Cell Biol. *168*, 1027–1038.

Ritzi, M., Tillack, K., Gerhardt, J., Ott, E., Humme, S., Kremmer, E., Hammerschmidt, W., and Schepers, A. (2003). Complex protein-DNA dynamics at the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. J. Cell Sci. *116*, 3971–3984.

Saridakis, V., Sheng, Y., Sarkari, F., Holowaty, M.N., Shire, K., Nguyen, T., Zhang, R.G., Liao, J., Lee, W., Edwards, A.M., *et al.* (2005). Structure of the p53 binding domain of HAUSP/USP7 bound to Epstein-Barr nuclear antigen 1 implications for EBV-mediated immortalization. Mol Cell *18*, 25–36.

Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J.L., Harwood, J., Diffley, J.F., and Hammerschmidt, W. (2001). Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. EMBO J. *20*, 4588–4602.

Sears, J., Kolman, J., Wahl, G.M., and Aiyar, A. (2003). Metaphase chromosome tethering is necessary for the DNA synthesis and maintenance of oriP plasmids but is insufficient for transcription activation by Epstein-Barr nuclear antigen 1. J Virol *77*, 11767–11780.

Sears, J., Ujihara, M., Wong, S., Ott, C., Middeldorp, J., and Aiyar, A. (2004). The amino terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) nuclear antigen 1 contains AT hooks that facilitate the replication and partitioning of latent EBV genomes by tethering them to cellular chromosomes. J Virol *78*, 11487–11505.

Shah, W.A., Ambinder, R.F., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1992). Binding of EBNA-1 to DNA creates a protease-resistant domain that encompasses the DNA recognition and dimerization functions. J Virol *66*, 3355–3362.

Shire, K., Ceccarelli, D.F., Avolio-Hunter, T.M., and Frappier, L. (1999). EBP2, a human protein that interacts with sequences of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 important for plasmid maintenance. J Virol *73*, 2587–2595.

Sivachandran, N., Cao, J.Y., and Frappier, L. (2010). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 Hijacks the host kinase CK2 to disrupt PML nuclear bodies. J Virol *84*, 11113–11123.

Uchida, S., Sekiguchi, T., Nishitani, H., Miyauchi, K., Ohtsubo, M., and Nishimoto, T. (1990). Premature chromosome condensation is induced by a point mutation in the hamster RCC1 gene. Mol Cell Biol *10*, 577–584.

Wu, D.Y., Krumm, A., and Schubach, W.H. (2000). Promoter-specific targeting of human SWI-SNF complex by Epstein-Barr virus nuclear protein 2. J Virol *74*, 8893–8903.

Wu, H., Kapoor, P., and Frappier, L. (2002). Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. J. Virol. *76*, 2480–2490.

Wysokenski, D.A., and Yates, J.L. (1989). Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. J. Virol. *63*, 2657–2666.

Xiao, B., Verma, S.C., Cai, Q., Kaul, R., Lu, J., Saha, A., and Robertson, E.S. (2010). Bub1 and CENP-F can contribute to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome persistence by targeting LANA to kinetochores. J. Virol. *84*, 9718–9732.

Yates, J.L., and Guan, N. (1991). Epstein-Barr virus-derived plasmids replicate only once per cell cycle and are not amplified after entry into cells. J. Virol. *65*, 483–488.

Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 3806–3810.

Yates, J.L., Warren, N., and sugden, B. (1985). Stable replication of plasmids derived from Epstein-barr virus in various mammalian cells. Nature *313*, 812–815.

Zhang, C., Goldberg, M.W., Moore, W.J., Allen, T.D., and Clarke, P.R. (2002). Concentration of Ran on chromatin induces decondensation, nuclear envelope formation and nuclear pore complex assembly. Eur. J. Cell Biol. *81*, 623–633.

Zhang, M.S., Arnaoutov, A., and Dasso, M. (2014). RanBP1 governs spindle assembly by defining mitotic Ran-GTP production. Dev. Cell *31*, 393–404.

TABLES

Construction name	Primers for gateway cloning
pDONR-EBNA1	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGACAGGACCTGCAAATGGCC-3' 5'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTCACTCCTGCCCTTCCTCAC-3'
pDONR-EBNA1 8-410	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGACAGGACCTGCAAATGGCC-3' 5'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTCACCCTACAGGGTGGAAAAATGG-3'
pDONR-EBNA1 381-Cter	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGCCCAGGAGTCCCAGTAGTCAG-3' 5'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTCACTCCTGCCCTTCCTCAC-3'
pDONR-RCC 1-20	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGTCACCCAAGCG-3' 5'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTTAGCTTTTGGGGATGGC-3'
pDONR-EBNA1 8-92nls	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGCCTAAGAAGAAGCGCAAAGTCGGACCTGGAAATGGCC-3' 3'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTCATCCTGCTCCTGTTCCACCG-5'
pDONR-EBNA1 323-410	5'-GGGGACAACTTTGTACAAAAAAGTTGGCATGGAGCAGGAGGTGGAGGC-3' 5'-GGGGACAACTTTGTACAAGAAAGTTGGTCACCCTACAGGGTGGAAAAATGG-3'
	Primers for Infusion cloning
pRFP-N1-EBNA1	5'-GGCAGGAGAAGGATCCGGCCTCCTCCGAGGACGTCATC-3' 5'-TCTAGAGTCGCGGCCGCGCAGAATTCTTAGGCGCCGGTGGA-3'
pRFP-C1-EBNA1	5'-CGCTAGCGCTACCGGTGAGCTCGGATCCATGGCCTCC 3' 5'-TCCAGGTCCTGTATCTGCAGTTCTATAGGCGCCGGTGGAGTG 3'
peGFP-N1-RCC1	5'-CTCAAGCTTCGAATTC ATGTCACCCAAGCGCATAG-3' 5'-GGCGACCGGTGGATCC GCTCTGTTCTTTGTCCTTGACTAA-3'
peGFP-C1-RCC1	5'-TCAAGCTTCGAATTCTGCAGGGACTTTCCCCAGCACAGCCAGCATGT-3' 5'-GCACGCATGATGTCTACTCACTCGGCAGGCGGGGGACATTC -3'
pRFP-N1-RCC1	5'-GGACTCAGATCTCGAGATGTCACCCAAGCGCATAGC-3' 5'-GGAGGAGGCCGGATCC**CC**GCTCTGTTCTTTGTCCTTGAC-3'
pRFP-C1-RCC1	5'-CGCTAGCGCTACCGGTATGGCCTCCTCCGAGGACG-3' 5'-GAAGCTTGAGCTCGAGCGCCGGTGGAGTGGCG
	Mutagenesis primers
peGFP-N1-EBNA1ΔGR1	5'-GGGGCTCCTGGATGGTTATCACCCCCTCTT-3' 5'-AAGAGGGGGTGATAACCATCCAGGAGCCCC-3'
peGFP-N1-EBNA1ΔRGR2	5'-CACGGTGGAACAGGAGAAAGAGCCAGGGGG-3' 5'-CCCCCTGGCTCTTTCTCCTGTTCCACCGTG-3'
pDEST15-RCC1 Δ1-20	
pDEST15-RCC1 Δ1-5	5'-GTACAAAAAAGTTGGCATAGCTAAAAGAAGGTCCC-3' 5'-GGGACCTTCTTTTAGCTATGCCAACTTTTTTGTAC-3'
pDEST15-RCC1 Δ6-	5'-GCATGTCACCCAAGCGCTCCCCCCCAGCAGATGC-3'

10	5’ GCATCTGCTGGGGGGGAGCGCTTGGGTGACATGC-3’
pDEST15-RCC1 Δ11-15	5’-GCATAGCTAAAAGAAGGGCCATCCCCAAAAGC-3’ 5’- GCTTTTGGGGATGGCCCTTCTTTTAGCTATGC-3’
pDEST15-RCC1 Δ16-20	5’-CCCCAGCAGATAAGAAGGTGAAGGTCTC-3’ 5’- GAGACCTTCACCTTCTTATCTGCTGGGG-3’
pDEST15-RCC1 SPAA	5’-GTTGGCATGTCACCCGCGGCCATAGCTAAAAGAAGGTCC-3’ 5’- GGACCTTCTTTTAGCTATGGCCGCGGGTGACATGCCAAC-3’
pDEST15-RCC1 AAKR	5’-GTACAAAAAAGTTGGCATGGCAGCCAAGCGCATAGC-3’ 5’- GCTATGCGCTTGGCTGCCATGCCAACTTTTTTGTAC-3’
pDEST15-RCC1 APKR	5’-GTACAAAAAAGTTGGCATGGCACCCAAGCGCATAGC-3’ 5’-GCTATGCGCTTGGGTGCCATGCCAACTTTTTTGTAC-3’
pDEST15-RCC1 SAKR	5’-GTACAAAAAAGTTGGCATGTCAGCCAAGCGCATAGC-3’ 5’GCTATGCGCTTGGCTGACATGCCAACTTTTTTGTAC-3’

Table 1: Oligonuclotides used for Infusion cloning and directed mutagenesis

Amplicon name	Primer sequences
pC9	F: CCCATGTTGTCACGTCACTC R: TGGCTATGGGCAACACATAA
pC77	F-TGCTACCCATGGCAACATTA R-AAACCACTTGCCCACAAAAC
pC15	F-TCGGGGGTGTTAGAGACAAC R-TGGCTATGGGCAACACATAA
pC39	F-AGAATGAAGAAGCAGGCGAA R-TTCCACGAGGGTAGTGAACC
pC1	F-TTGGCAAGTTGTACCAACCA R-TACGAGGAGCGCTTTTGTTT
B-glob	F-CCCTTGGACCCAGAGGTTCT R-CGAGCACTTTCTTGCCATGA
K1	F-CGGGCGTGATGGAGGCTATG R-AGACAGAGGCCACCACGG

Table 2. ChIP primers

LEGENDS TO FIGURES

Figure 1. Deletion of EBNA1 AT-hook domains drastically affects EBNA1-mediated transcriptional activation but has no impact on EBV's association with the metaphasic chromosomes. (A) Schematic representation of EBNA1 and AT-hook deletion mutants. GR: glycine/arginine-rich region; GAr: glycine/alanine-rich region; DBD: DNA-binding domain; NLS: Nuclear Localization Signal; Ac: acidic. ΔGR1 corrresponds to a deletion mutant deleted from aa 40 to 63, ΔGR2 from aa 325 to 366 and ΔGR from both regions (B) Confocal microscopy analysis of EBNA1 and EBNA1ΔGR during metaphase. HeLa cells were transfected with expression vectors for either GFP-EBNA1 or GFP-EBNA1ΔGR and the localization of the proteins was assessed in live cells by confocal microscopy. (C) Schematic representation of reporter plasmid pGK2-FR-TK-Luc. TK: herpes simplex virus thymidine kinase promoter; FR: Family of repeats. (D) HEK293T cells were transfected with the pGL2-FR-TK-Luc reporter plasmid either alone or together with expression vectors for EBNA1 or EBNA1 deletion mutants as indicated in the figure. Relative levels of luciferase activity are reported on the graph. Error bars represent standard deviation from three replicate assays.

Figure 2. EBNA1 and RCC1 interact directly. (A) Expression plasmids for Flag.RCC1, Flag.EBNA1ΔGA, Myc-RCC1 and Myc-EBNA1ΔGA were transfected into HeLa cells as indicated. Cellular extracts were immunoprecipitated with M2 anti-Flag mAb affinity gel and the immunoprecipitated complexes were analysed by western blotting using an anti-Flag polyclonal antibody or an anti-Myc antibody. Input corresponds to 8% of the cell extract used for immunoprecipitation. (B) 500 ng of purified 6his-EBNA1ΔGA protein were incubated with similar amounts of purified GST or GST-RCC1 bound to glutathione sepharose beads. The EBNA1-bound proteins were analysed by western blotting using an anti-his6 antibody. Input corresponds to 100 ng of purified 6his-EBNA1ΔGA.

Figure 3. EBNA1 Linking regions 1 (LR1) and 2 (LR2) are involved in the interaction with RCC1. (A) Schematic representation of EBNA1. Abbreviations as in Figure 1. (B - D) Expression plasmids for GFP-tagged (B and D) or Flag-tagged (C) EBNA1 and EBNA1 deletion mutants, as indicated in the figure (left panel) were transfected into HeLa cells. Cellular extracts were then incubated with similar amounts of GST or GST-RCC1 proteins bound to glutathione sepharose beads. Bound proteins were analysed by western blotting (right panels) using either an anti-GFP antibody (B and D) or an anti-Flag antibody (C). Input corresponds to 10% of cell extract used for the GST-pull down.

Figure 4. RCC1 interacts with EBNA1 via its 20 amino acid N-terminal tail.
(A) Schematic representation of RCC1. N- and C- terminal regions of RCC1 surround a seven bladed propeller domain (in gray). Residues 1 to 27 corresponding to the N-terminal tail are represented below. The bi-partite NLS, and phosphorylation sites on and 11 are indicated as well as the α-N-tri-methylation of serine 2 that follows cleavage of the initial methionine indicated between brackets. (B and C) Expression plasmids for Flag-EBNA1 were transfected into HeLa cells, and cellular extracts incubated with similar amounts of GST, GST-RCC1 or GST-RCC1 deletion (B) or point (C) mutants bound to glutathione sepharose beads as indicated. Bound proteins were analysed by western blotting using an anti-Flag antibody. Input corresponds to 10% of the cell extract used for the GST-pulldown.

Figure 5. Probing EBNA1 peptide arrays for RCC1 interaction sites. (A) Arrays of immobilized peptide spots of overlapping 25-mer peptides covering the entire sequence of EBNA1 (including the GA repeat) were probed with recombinant GST-RCC1, GST-RCC1Δ1-20, GST-RCC1 1-20 and GST and revealed by incubation with a specific anti-GST antibody. Light blue, blue and red rectangles respectivaly indicate low, medium and high affinity binding to contiguous interacting peptides. The limits of the interacting regions are indicated for each rectangle by the positions of the first aa of the first peptide and the last aa of the last peptide. * It is to be noted that the GST-RCC1Δ1-20 array shown in the figure is the result of a longer exposure compared to the other arrays. (B) Schematic representation of EBNA1 and its interaction regions with RCC1 as determined by the peptide array. Abbreviations are similar to those indicated in Figure 1. * indicates the position of the protein kinase 2 (CK2) binding sites. USP7: Ubiquitin Specific Peptidase 7.

Figure 6: Characterization of amino acids within EBNA1 region 401 to 430 that are important for interaction with the RCC1 N-terminal 20 amino acid tail. Array of alanine-scanning substitution of EBNA1's 396-435 region together with N- and C-terminal deletion peptides was probed with GST-RCC1 1-20 followed by incubation with a specific GST antibody. The list of peptides deposited on the array is given below: ala substitution peptides are numbered from 1 to 34 (left panel); deletion peptides are numbered from 35 to 64 (right panel). The core interacting domain is represented in bold black, ala replacement in dark gray, notable peptides are highlighted in light gray. The interaction evaluation is given as : (++) strong binding, (+) intermediate binding, (+/-) low binding and (-) no binding.

Figure 7. FR-specific RCC1-binding efficiency correlates with the presence of EBNA1. (A) Schematic representation of the *oriP* region of pCEP4, depicting the location of the fragments amplified in the ChIP-qPCR assays. (B and C) ChIP analysis of EBNA1 (A) and

RCC1 (B) respective binding to the *oriP* FR region. HeLa cells were transfected with pCEP4-EBNA1mut, together with expression plasmids for Flag-RCC1 alone (white bars) or for Flag-RCC1 and EBNA1 (gray bars). ChIP was realised using either an anti-EBNA1 antibody (A) or an anti-Flag antibody (B). Results are the results of triplicates and are expressed as the percentage of input chromatin.

Figure 8. Dynamic localization of EBNA1 and RCC1 throughout the cell cycle. Hela cells coexpressing RFP-EBNA1 and EGFP-RCC1 were observed by confocal microscopy at different stages of the cell cycle as indicated. Images show single confocal z-section. Trans: Transmission.

Figure 9. FRET analysis of EGFP-EBNA1 and RFP-RCC1 interaction at different stages of the cell cycle. Hela cells coexpressing EGFP-EBNA1 and RFP-RCC1 were analysed by Förster resonance energy transfer (FRET) at different stages of the cell cycle as indicated. Analysis were performed using ImageJ software 'FRET Analyzer'. Results are presented as three images, considering small, average or high bleedthrough level (noted as low, medium or high cut-off). High cut-off images are the most representative of the FRET signals. FRET signal is represented using a firescale gradient: blue color means no FRET signal, yellow color means maximum FRET signal.

Figure 1 :

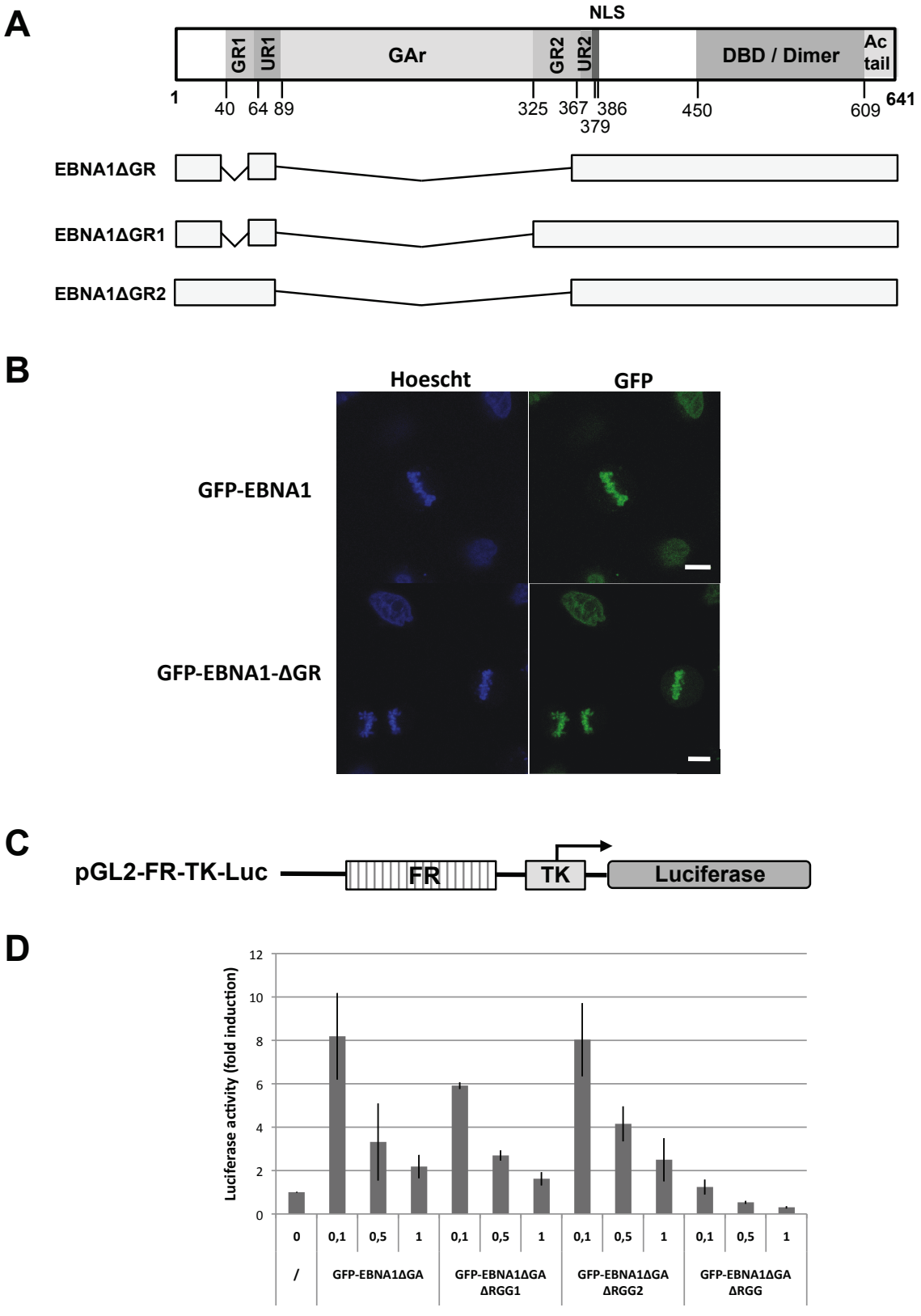

A
NLS
GR1
UR1
GAr
GR2
UR2
DBD / Dimer
Ac tail
1
40
64
89
325
367
379
386
450
609
641
EBNA1ΔGR
EBNA1ΔGR1
EBNA1ΔGR2
B
Hoescht
GFP
GFP-EBNA1
GFP-EBNA1-ΔGR
C
pGL2-FR-TK-Luc
FR
TK
Luciferase
D
Luciferase activity (fold induction)
0
2
4
6
8
10
12
0
0,1
0,5
1
/
GFP-EBNA1ΔGA
GFP-EBNA1ΔGA ΔRGG1
GFP-EBNA1ΔGA ΔRGG2
GFP-EBNA1ΔGA ΔRGG

Figure 2 :

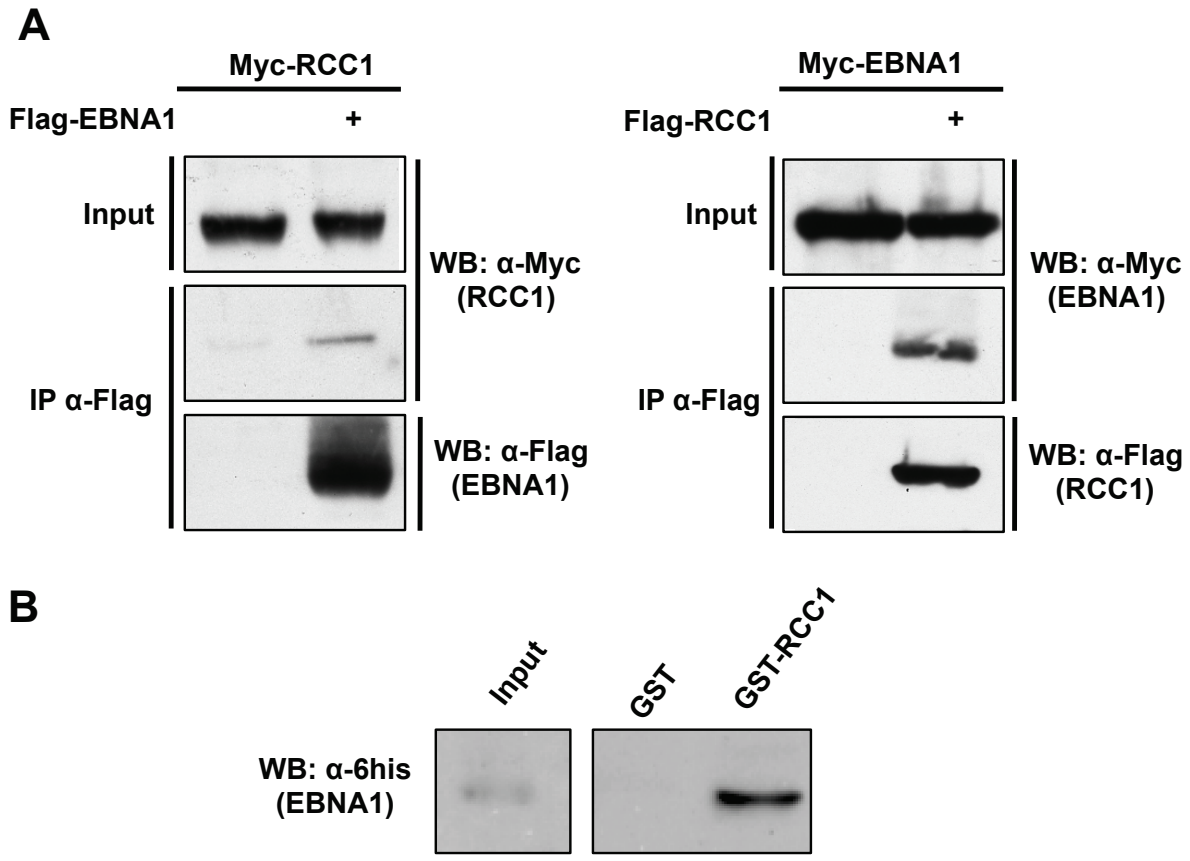

A
Myc-RCC1
Flag-EBNA1
+
Input
IP α-Flag
WB: α-Myc (RCC1)
WB: α-Flag (EBNA1)
Myc-EBNA1
Flag-RCC1
+
Input
IP α-Flag
WB: α-Myc (EBNA1)
WB: α-Flag (RCC1)
B
Input
GST
GST-RCC1
WB: α-6his (EBNA1)

Figure 3 :

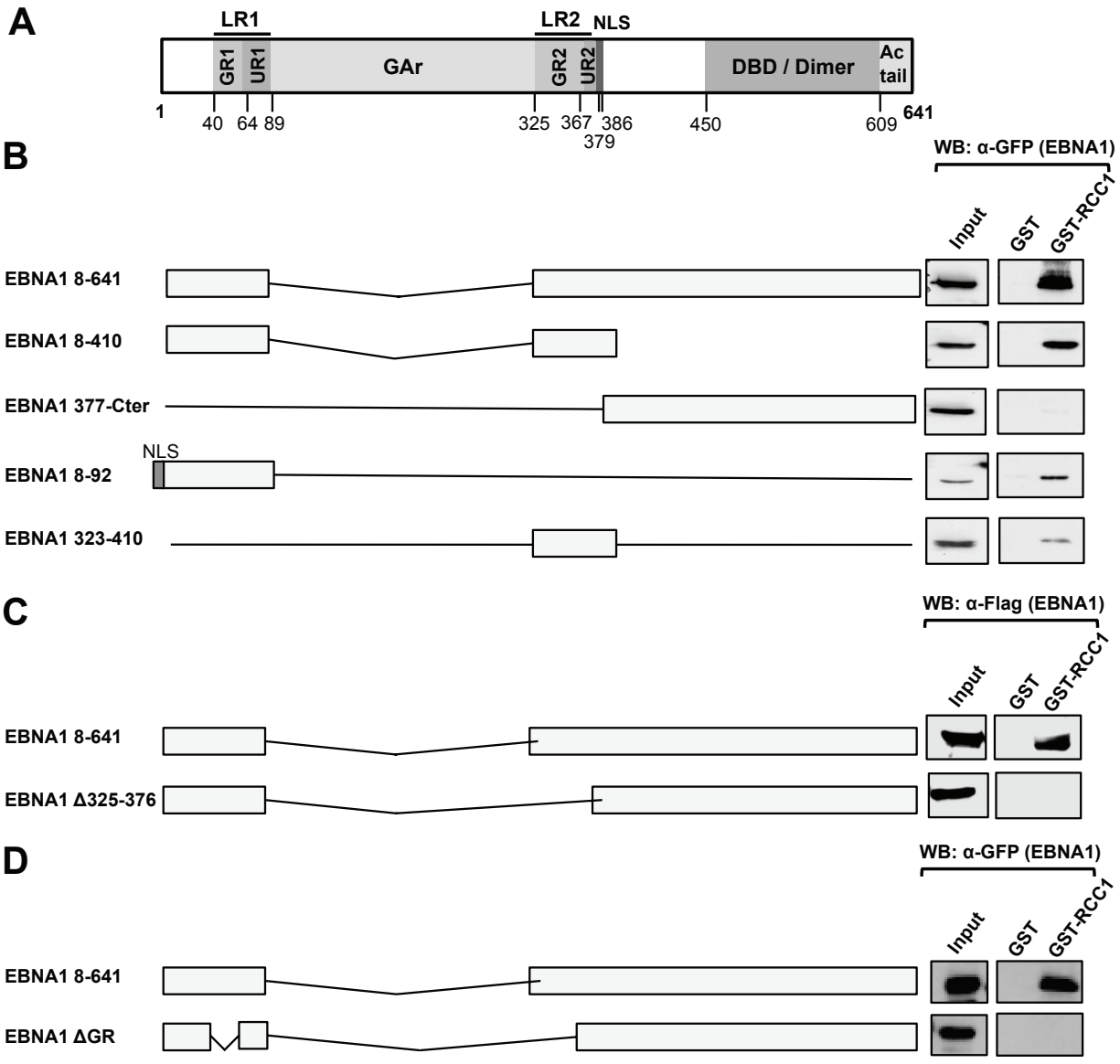

A
LR1
LR2
NLS
GR1
UR1
GAr
GR2
UR2
DBD / Dimer
Ac tail
1
40
64
89
325
367
379
386
450
609
641
B
WB: α-GFP (EBNA1)
Input
GST
GST-RCC1
EBNA1 8-641
EBNA1 8-410
EBNA1 377-Cter
NLS
EBNA1 8-92
EBNA1 323-410
C
WB: α-Flag (EBNA1)
Input
GST
GST-RCC1
EBNA1 8-641
EBNA1 Δ325-376
D
WB: α-GFP (EBNA1)
Input
GST
GST-RCC1
EBNA1 8-641
EBNA1 ΔGR

Figure 4 :

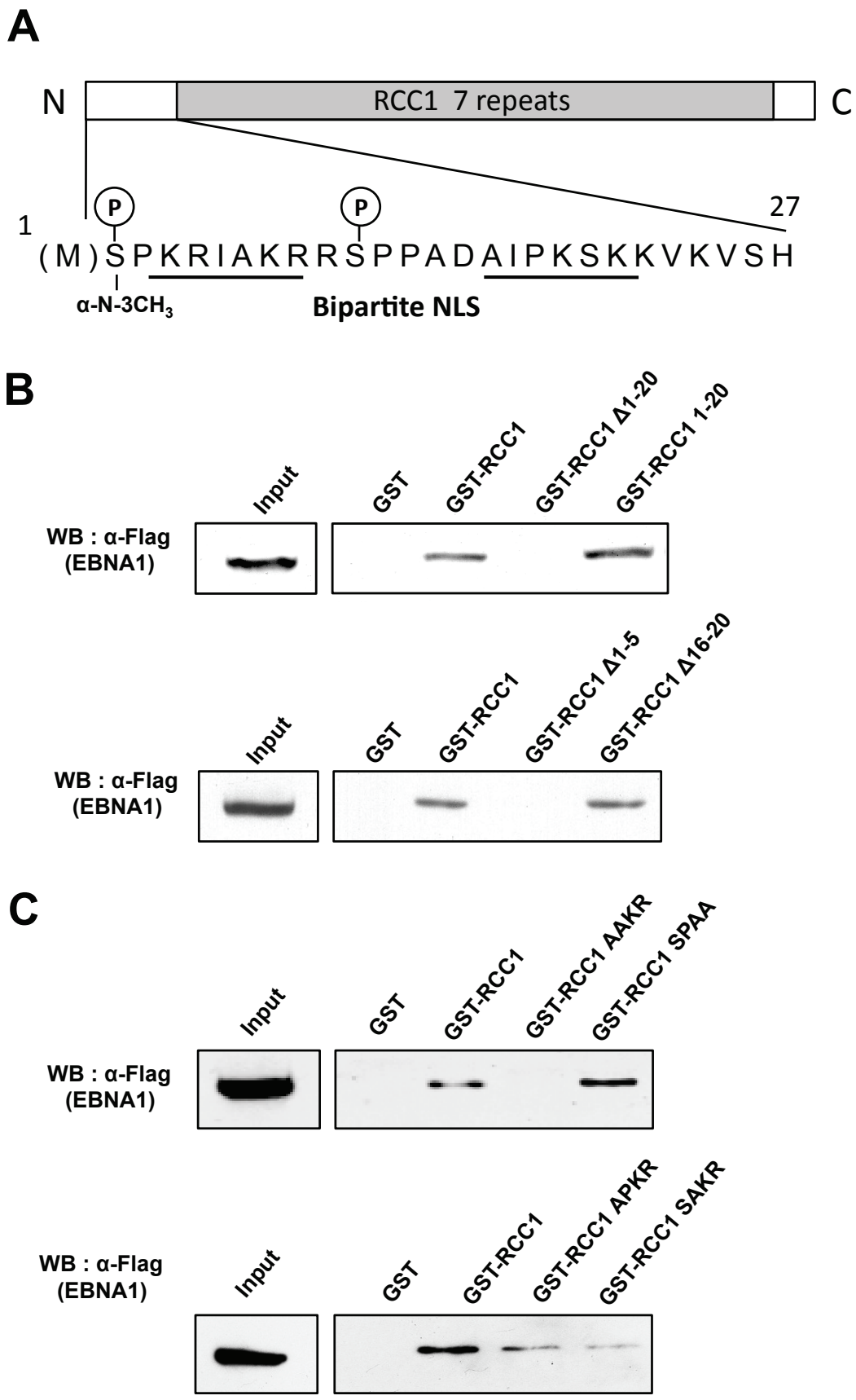

A
N
RCC1 7 repeats
C
1
P
P
27
(M)SPKRIAKRRSPPADAIPKSKKVKVSH
α-N-3CH3
Bipartite NLS
B
Input
GST
GST-RCC1
GST-RCC1 Δ1-20
GST-RCC1 1-20
WB : α-Flag
(EBNA1)
Input
GST
GST-RCC1
GST-RCC1 Δ1-5
GST-RCC1 Δ16-20
WB : α-Flag
(EBNA1)
C
Input
GST
GST-RCC1
GST-RCC1 AAKR
GST-RCC1 SPAA
WB : α-Flag
(EBNA1)
Input
GST
GST-RCC1
GST-RCC1 APKR
GST-RCC1 SAKR
WB : α-Flag
(EBNA1)

Figure 5 :

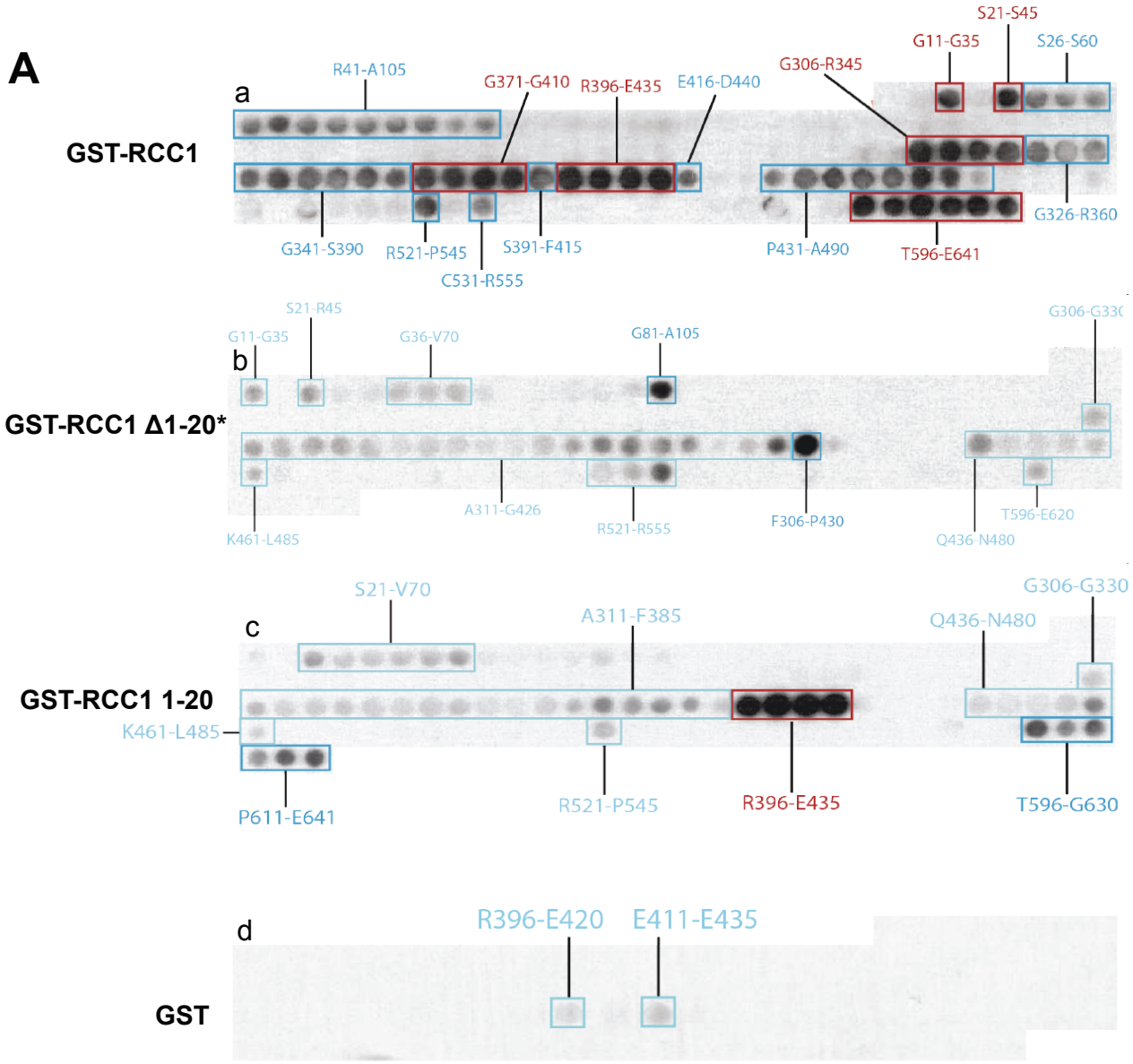

A
a
GST-RCC1
R41-A105
G371-G410
R396-E435
E416-D440
G306-R345
S21-S45
G11-G35
S26-S60
G326-R360
G341-S390
R521-P545
C531-R555
S391-F415
P431-A490
T596-E641
b
GST-RCC1 Δ1-20*
S21-R45
G11-G35
G36-V70
G81-A105
G306-G33
K461-L485
A311-G426
R521-R555
F306-P430
T596-E620
Q436-N480
c
GST-RCC1 1-20
S21-V70
A311-F385
G306-G330
Q436-N480
K461-L485
P611-E641
R521-P545
R396-E435
T596-G630
d
GST
R396-E420
E411-E435

Figure 5 (suite) :

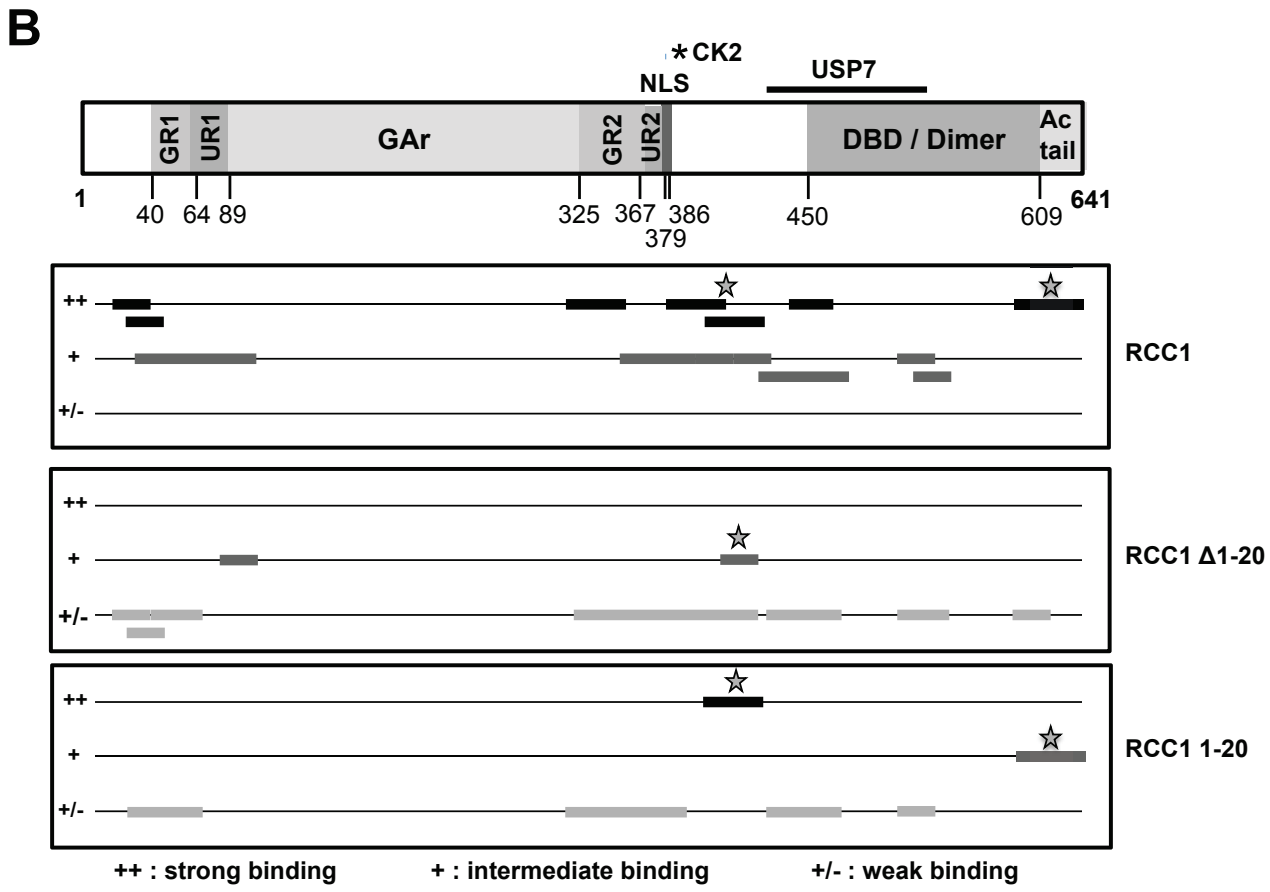
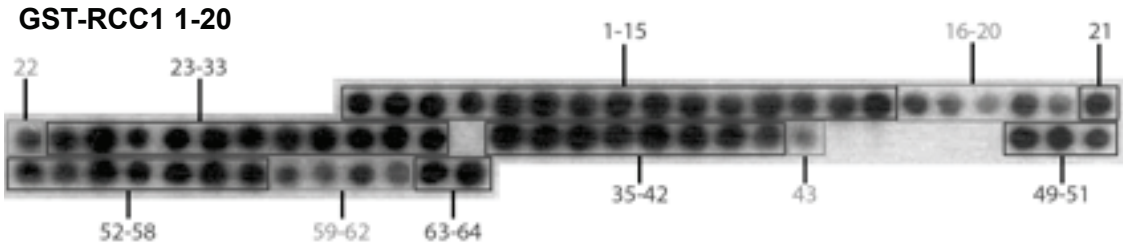


Figure 6 :



1	GRRPFFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	ARRPFFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	GARPFFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	GRAPFFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
5	GRRAFFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	GRRPAFHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	GRRPFAHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	AHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
10	FAPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	FHAVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	FHPAG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	FHPVA**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	FHPVG**AADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
15	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	FHPVG**EAAYFEYHQE**GGPDGEPDVP	+
	FHPVG**EADAFEYHQE**GGPDGEPDVP	+
	FHPVG**EADYAEYHQE**GGPDGEPDVP	+/-
	FHPVG**EADYFAYHQE**GGPDGEPDVP	+
20	FHPVG**EADYFEAHQE**GGPDGEPDVP	+
	FHPVG**EADYFEYAQE**GGPDGEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHAE**GGPDGEPDVP	+
	FHPVG**EADYFEYHQA**GGPDGEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**AGPDGEPDVP	++
25	FHPVG**EADYFEYHQE**GAPDGEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGADGEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPAGEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDAEPDVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGAPDVP	++
30	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEADVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPAVP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDAP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVA	++
	FHPVG**AAAYFAYHQA**GGPDGEPDVP	-

35	HPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	PVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	VG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	G**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	EADYFEYHQEGGPDGEPDVP	++
40	**ADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++
	DYFEYHQEGGPDGEPDVP	++
	YFEYHQEGGPDGEPDVP	++
	FEYHQEGGPDGEPDVP	+/-
	EYHQEGGPDGEPDVP	-
45	**YHQE**GGPDGEPDVP	-
	HQEGGPDGEPDVP	-
	QEGGPDGEPDVP	-
	EGGPDGEPDVP	-
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDV	++
50	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPD	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGE	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDG	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPD	++
55	FHPVG**EADYFEYHQE**GGP	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GG	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**G	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**	++
	FHPVG**EADYFEYHQ**	+/-
60	FHPVG**EADYFEYH**	+/-
	FHPVG**EADYFEY**	+
	FHPVG**EADYFE**	+/-
	EADYFEYHQE	++
	FHPVG**EADYFEYHQE**GGPDGEPDVP	++

Figure 7 :

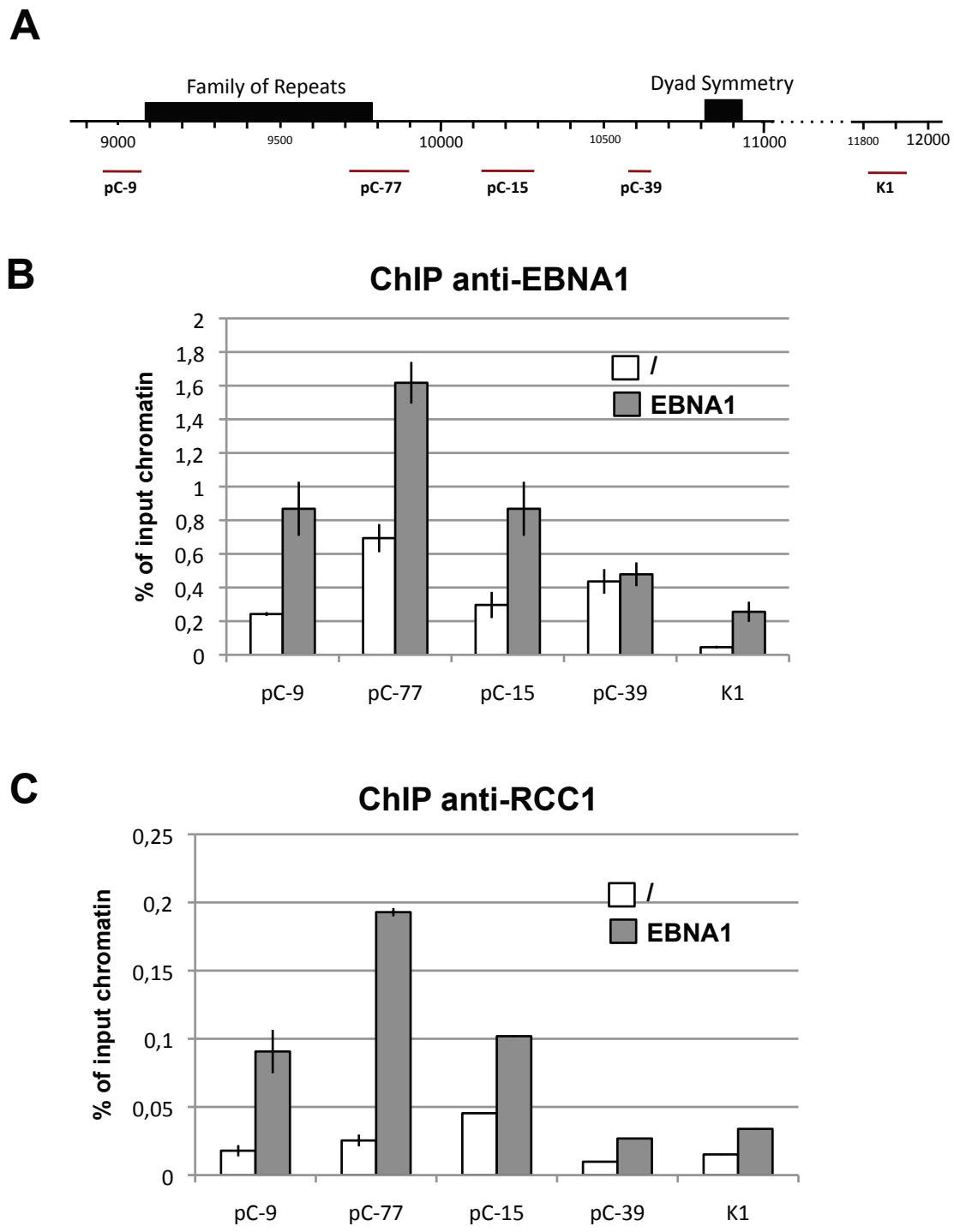

A
Family of Repeats
Dyad Symmetry
9000
9500
10000
10500
11000
11800
12000
pC-9
pC-77
pC-15
pC-39
K1
B
ChIP anti-EBNA1
% of input chromatin
2
1,8
1,6
1,4
1,2
1
0,8
0,6
0,4
0,2
0
/
EBNA1
pC-9
pC-77
pC-15
pC-39
K1
C
ChIP anti-RCC1
% of input chromatin
0,25
0,2
0,15
0,1
0,05
0
/
EBNA1
pC-9
pC-77
pC-15
pC-39
K1

Figure 8 :

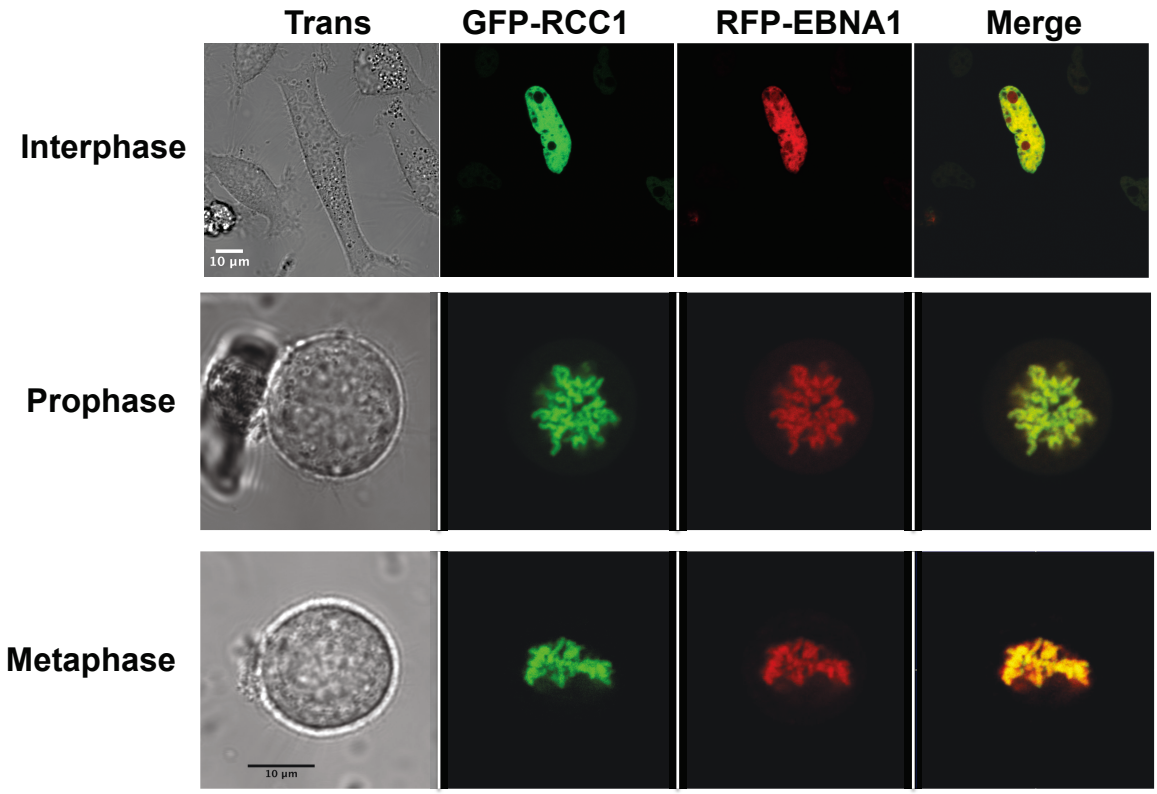
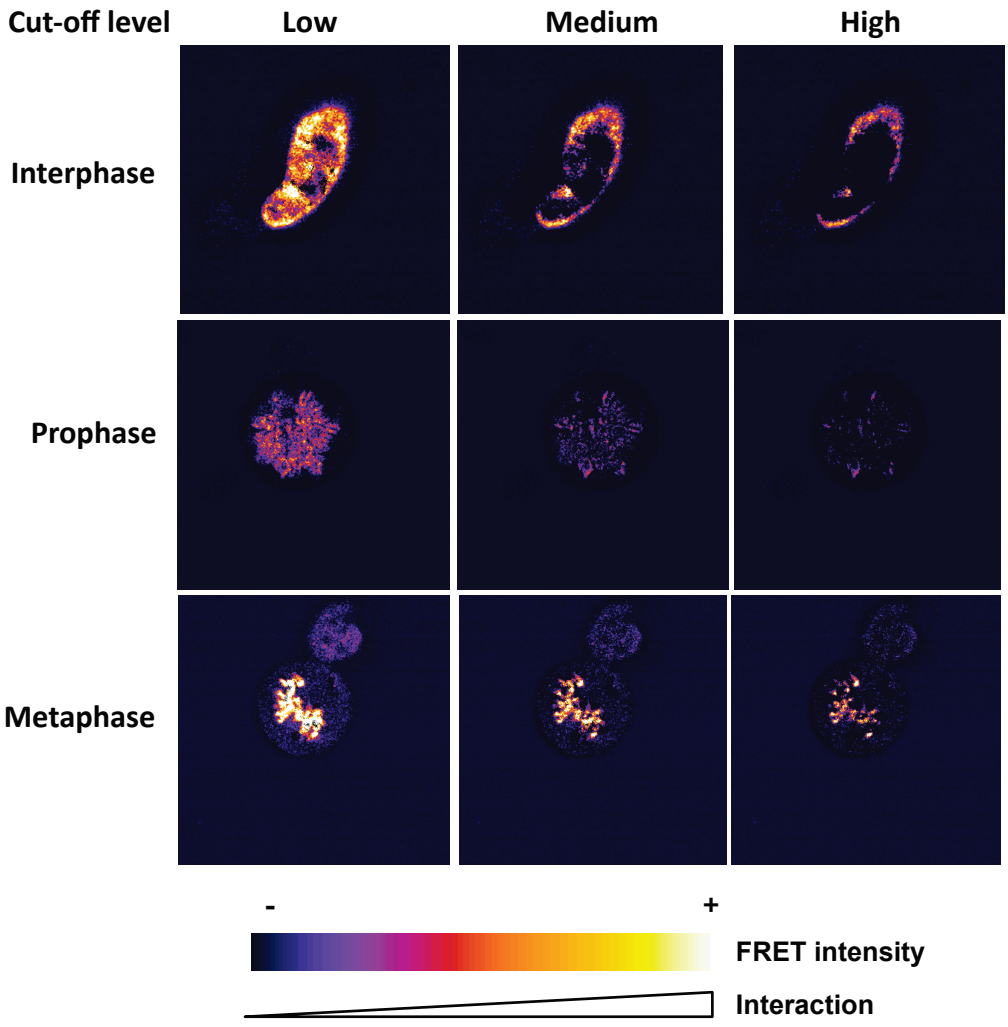

Trans
GFP-RCC1
RFP-EBNA1
Merge
Interphase
Prophase
Metaphase
10 µm
10 µm

Figure 9 :


Cut-off level
Low
Medium
High
Interphase
Prophase
Metaphase
-
+
FRET intensity
Interaction

II. Étude de l'interaction entre EBNA1 et RCC1

Pour l'ensemble de nos analyses, nous avons utilisé la protéine EBNA1 amputée de la région Glycine-Alanine, pour simplifier la notation la protéine EBNA1ΔGA sera notée simplement EBNA1. Il est à noter cependant que dans le plasmide pCEP4, la protéine EBNA1 exprimée est la protéine entière.

1. Confirmation de l'interaction entre EBNA1 et RCC1 par BiFC

Afin de valider l'interaction entre EBNA1 et RCC1 dans un modèle cellulaire, nous avons également exploité une approche de BiFC (*Bimolecular Fluorescence Complementation*). Brièvement, la protéine fluorescente Coral-Hue est séparée en 2 parties (CH1 et CH2), chacune étant clonée dans un vecteur d'expression. Les gènes codant pour EBNA1 et RCC1 ont été clonés en phase des séquences codant les parties CH1 et CH2 de la protéine Coral-Hue par la technologie Gateway (**figure 21-A**). Les différents plasmides sont transfectés en tandem dans des cellules HEK-293T et la fluorescence de la Coral-Hue est analysée par FACS. Si les deux protéines fusions interagissent, cela reconstitue la protéine Coral-Hue entière et permet l'émission de fluorescence après excitation à 490 nm (**figure 21-B**).

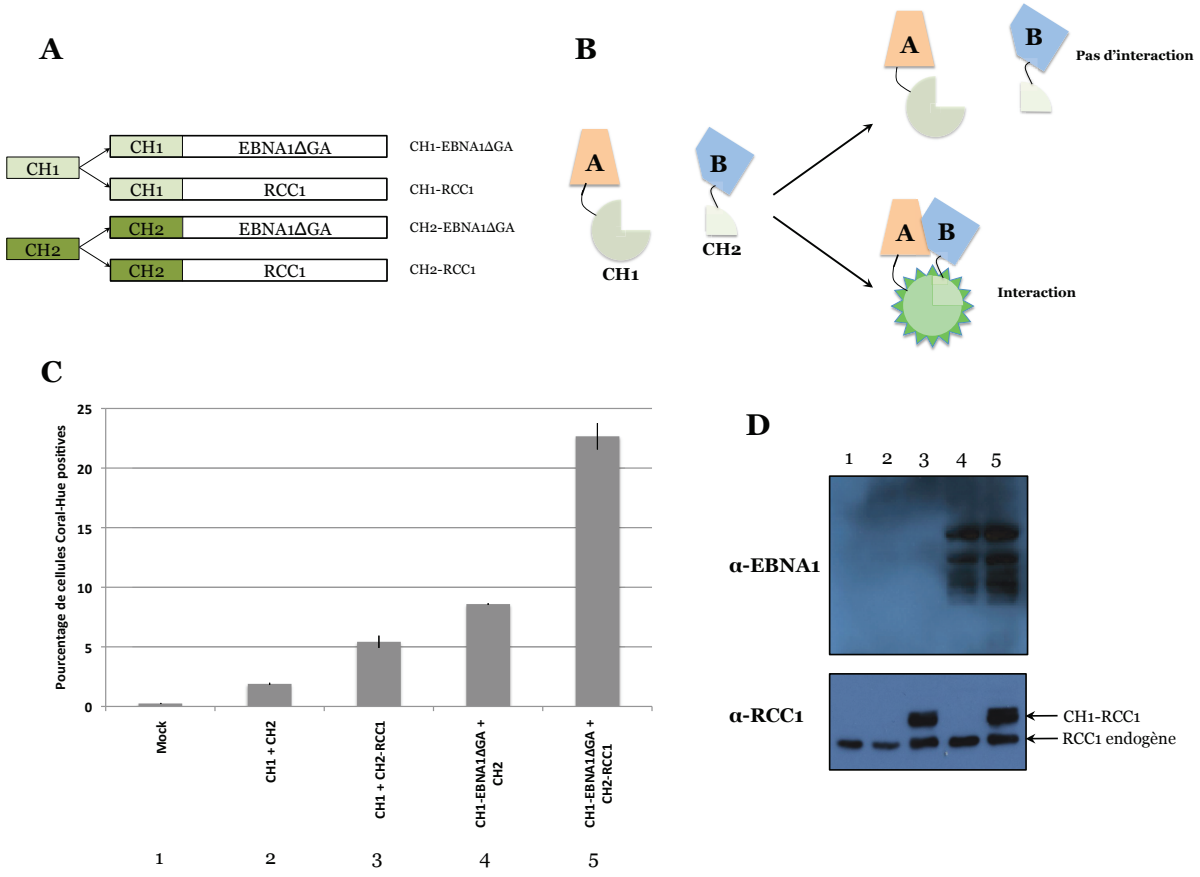


Figure 21 Confirmation de l'interaction par une approche de BiFC

(A) Schéma des vecteurs d'expressions utilisés. (B) Schéma de la méthode de BiFC. (C) Le pourcentage de cellules Coral-Hue positives est évalué par FACS pour chaque couple de vecteurs utilisés. (D) Evaluation de l'expression des différentes protéines par western-blot.

Nous avons dans un premier temps étudié le bruit de fond produit par la co-transfection d'un plasmide codant les parties CH1 ou CH2 avec les plasmides codant pour les fusions EBNA1 et RCC1. De manière systématique, l'expression des protéines fusions EBNA1 avec le fragment complémentaire de la Coral-Hue engendre le plus de bruit de fond, avec un maximum observé pour CH1 + CH2-EBNA1. Nous avons ainsi sélectionné le couple CH1-EBNA1 et CH2-RCC1 pour l'analyse. Les résultats **figure 21-C** montrent que les transfections contrôles (de 1 à 4) induisent encore un bruit de fond de 8 % maximum de cellules Coral-Hue positives. Cependant, plus de 20 % des cellules sont positives pour la transfection CH1-RCC1 + CH2-EBNA1. L'expression des différentes protéines a été vérifiée par western blot (**figure 21-D**). Ces résultats nous permettent de valider l'interaction entre EBNA1 et RCC1 à l'aide d'une approche différente mais également dans un modèle exploitant des cellules vivantes. L'intensité du bruit de fond constatée reste néanmoins importante rendant cette approche peu quantitative.

2. La queue N-terminale de RCC1 est essentielle à l'interaction avec EBNA1 dans les cellules

Nos données de GST-Pulldown démontrent le rôle essentiel de la queue N-terminale de RCC1 dans l'interaction avec EBNA1. Nous avons testé son importance dans un contexte cellulaire par des études de co-immunoprécipitation. Des cellules HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expressions codant pour les protéines fusions Flag-RCC1, Flag-RCC1Δ1-27 et Myc-EBNA1. Une immunoprécipitation est ensuite réalisée avec un anticorps α-Flag de souris. La protéine Myc-EBNA1 co-immunoprécipite avec la protéine Flag-RCC1 mais aussi avec la protéine Flag-RCC1Δ1-27 (**figure 22-A**). Ce résultat est en contradiction avec les résultats obtenus précédemment par GST-Pulldown (**figure 4-B** du papier). L'hypothèse la plus probable est que la protéine RCC1 endogène interagirait avec le mutant RCC1Δ1-27 et permettrait ainsi l'interaction avec EBNA1. Afin de tester cela, nous avons étudié la capacité de la protéine RCC1 à interagir avec elle-même. Comme le montre la **figure 22-B**, la protéine Myc-RCC1 co-immunoprécipite avec les protéines Flag-RCC1 et Flag-RCC1Δ1-27. Par ailleurs, après traitement par la DNase, il y a une diminution d'interaction entre Myc-RCC1 et Flag-RCC1Δ1-27. Deux cas de figure sont possibles, (i) RCC1 forme un homodimère ou (ii) deux molécules de RCC1 se retrouvent sur le même nucléosome ce qui permet la précipitation du complexe, cette hypothèse étant favorisée compte tenu de la diminution d'interaction en présence de la DNase.

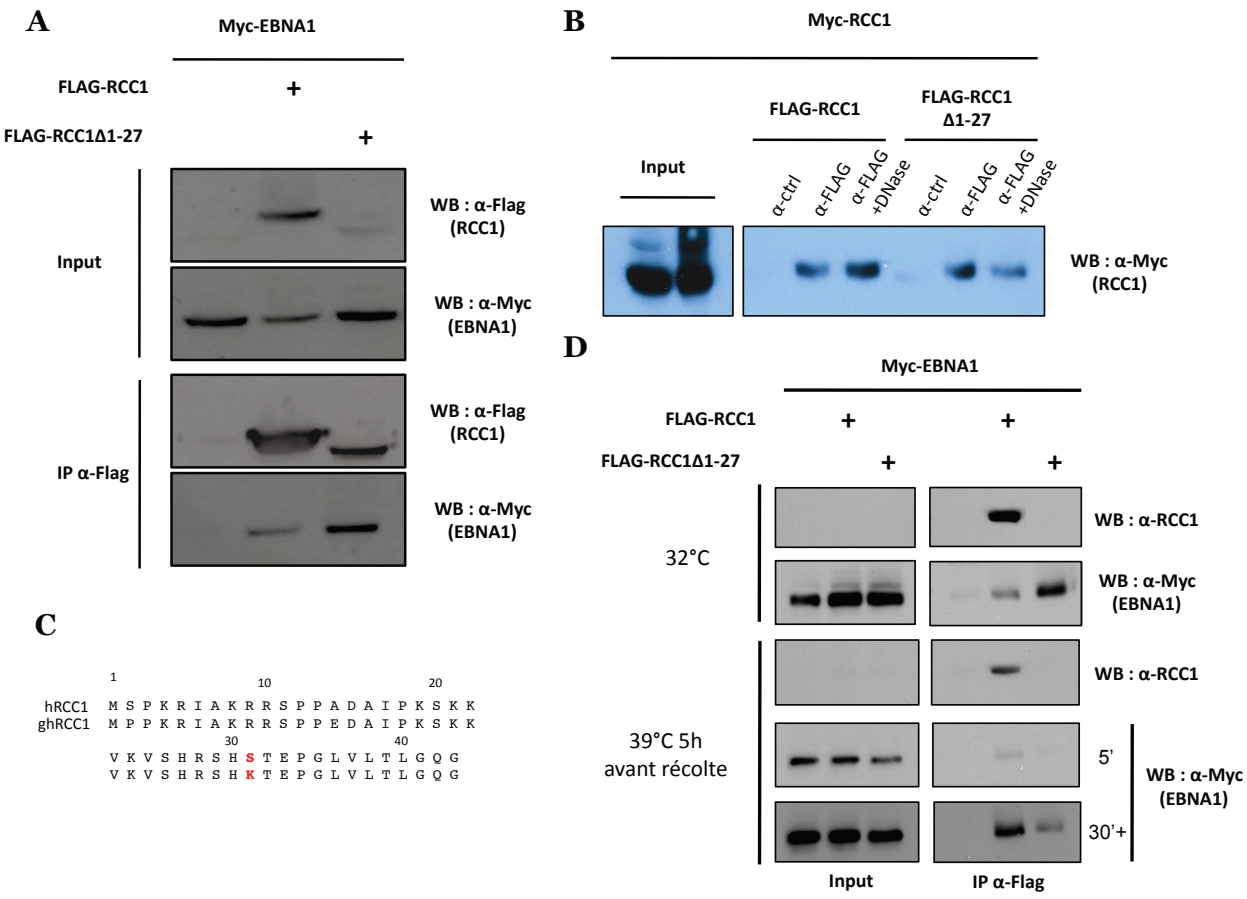


Figure 22 : La queue N-terminale de RCC1 est impliquée dans l'interaction avec EBNA1 *in cellulo*

(A) Des cellules HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expressions codant pour les protéines Myc-EBNA1, Flag-RCC1 et Flag-RCC1Δ1-27. Une immunoprécipitation est réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Flag, les complexes sont révélés par westernblot. (B) Des cellules HeLa ont été transfectées par des vecteurs d'expressions codant pour les protéines Myc-RCC1, Flag-RCC1 et Flag-RCC1Δ1-27. Une immunoprécipitation est réalisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitope Flag ou un anticorps contrôle. À la suite de l'immunoprécipitation, un traitement à la DNase est effectué (10 min d'incubation à température ambiante). Les complexes sont ensuite rélévés par westernblot. (C) Séquence de la queue N-terminale des protéines RCC1 humaine (hRCC1) et d'hamster doré (ghRCC1). (D) La même expérience de co-immunoprécipitation qu'en (A) est réalisée en utilisant des cellules tsBN2, thermosensible pour la protéine RCC1. Les cellules sont cultivées et récoltées à 32°C ou cultivées à 32°C puis à 39°C 5 h avant récolte (5' et 30'+ représente le temps d'exposition du film autoradiographique).

Enfin, nous avons exploité la lignée de hamster doré tsBN2, thermosensible pour RCC1, pour tester l'interaction des mutants de la protéine RCC1. Dans cette lignée, une mutation ponctuelle de la protéine RCC1 (ghRCC1 pour *golden hamster* RCC1) induit sa dégradation à 39°C (Uchida *et al.* 1990). Cette lignée nous permet ainsi d'éliminer la fraction de protéine endogène RCC1 pour n'avoir que la fraction issue de la transfection. Les séquences des régions N-terminales entre les protéines hRCC1 et ghRCC1 sont très proches et cette similitude nous laisse supposer que ghRCC1 est susceptible d'interagir avec EBNA1 (**figure 22-C**). De manière similaire à l'expérience précédente **figure 22-A,** nous avons transfecté

les cellules tsBN2 avec les plasmides codant pour les gènes Flag-RCC1, Flag-RCC1Δ1-27 et Myc-EBNA1. Les cellules ont été cultivées et récoltées à 32°C ou cultivées à 32°C et transférées à 39°C 5 h avant la récolte, durée suffisante pour la dégradation de la protéine RCC1 endogène. Les protéines immunoprécipitées par l'anticorps α-Flag sont révélées par westernblot. L'utilisation d'un anticorps spécifique contre la protéine RCC1 devait permettre de suivre la dégradation de la protéine ghRCC1 endogène et de l'immunoprécipitation des protéines fusion Flag-RCC1 et Flag-RCC1Δ1-27. Cependant, bien que la protéine Flag-RCC1 soit bien détectée par l'anticorps dans l'immunoprécipitation, ni la protéine ghRCC1 ni la protéine Flag-RCC1Δ1-27 ne sont reconnues par l'anticorps. La société abcam, qui commercialise cet anticorps, nous a confirmé que la région immunogène utilisée pour générer l'anticorps se situait au niveau des 40 premiers acides-aminés de RCC1 ce qui expliquerait pourquoi la protéine RCC1Δ1-27 n'est pas reconnue. Concernant la protéine endogène de hamster, l'absence de reconnaissance provient peut-être du polymorphisme de l'acide aminé 31. Lorsque les cellules sont cultivées à température permissive, la protéine Myc-EBNA1 co-immunoprécipite avec les 2 variants de RCC1. À température restrictive, Myc-EBNA1 co-immunoprécipite toujours avec Flag-RCC1 mais moins avec Flag-RCC1Δ1-27 d'autant que, au vue de la quantité de Myc-EBNA1 co-immunoprécipitée par Flag-RCC1Δ1-27, on peut supposer une meilleure expression de cette protéine comparée à Flag-RCC1 (**figure 22-D**). L'absence de signal pour la protéine Flag-RCC1 dans les *input* est un phénomène que nous observons parfois sans avoir d'explication. Ces résultats confirment que l'interaction observée **figure 22-A** est due à la présence de la protéine RCC1 endogène et que la queue N-terminale de RCC1 est impliquée dans l'interaction avec EBNA1.

3. L'interaction avec EBNA1 n'empêche pas RCC1 d'interagir avec Ran

RCC1 interagit avec la protéine Ran pour catalyser l'échange d'un GDP en GTP. Nous avons voulu évaluer l'interaction entre la protéine RCC1 et la protéine Ran par co-immunoprécipitation en présence de la protéine EBNA1. Pour cela, des cellules HeLa ont été transfectées par des plasmides codant pour les protéines Flag-RCC1, HA-Ran et Myc-EBNA1. Après immunoprécipitation, les complexes ont été révélés par westernblot. Comme le montre la **figure 23-A**, l'immunoprécipitation de la protéine Flag-RCC1 co-immunoprécipite les protéines Ran mais également EBNA1. Par ailleurs, une quantité croissante de plasmide codant le gène HA-Ran augmente d'une part la quantité de Flag-RCC1 immunoprécipitée et dans un même temps la quantité de Myc-EBNA1 co-immunoprécipitée. De plus, l'immunoprécipitation de Flag-EBNA1 conduit à la co-immunoprécipitation de la protéine HA-Ran (**figure 23-B**). La quantité de HA-Ran co-immunoprécipitée est supérieure lorsque l'on surexprime la protéine Myc-RCC1 à l'aide d'un vecteur d'expression. Ainsi l'interaction

entre EBNA1 et RCC1 n'abroge pas le recrutement de Ran sur RCC1. Il semblerait qu'un complexe Ran-RCC1-EBNA1 se forme. Il est vraisemblable que l'interaction observée entre EBNA1 et Ran en absence de Myc-RCC1 soit due à la présence de la protéine RCC1 endogène.

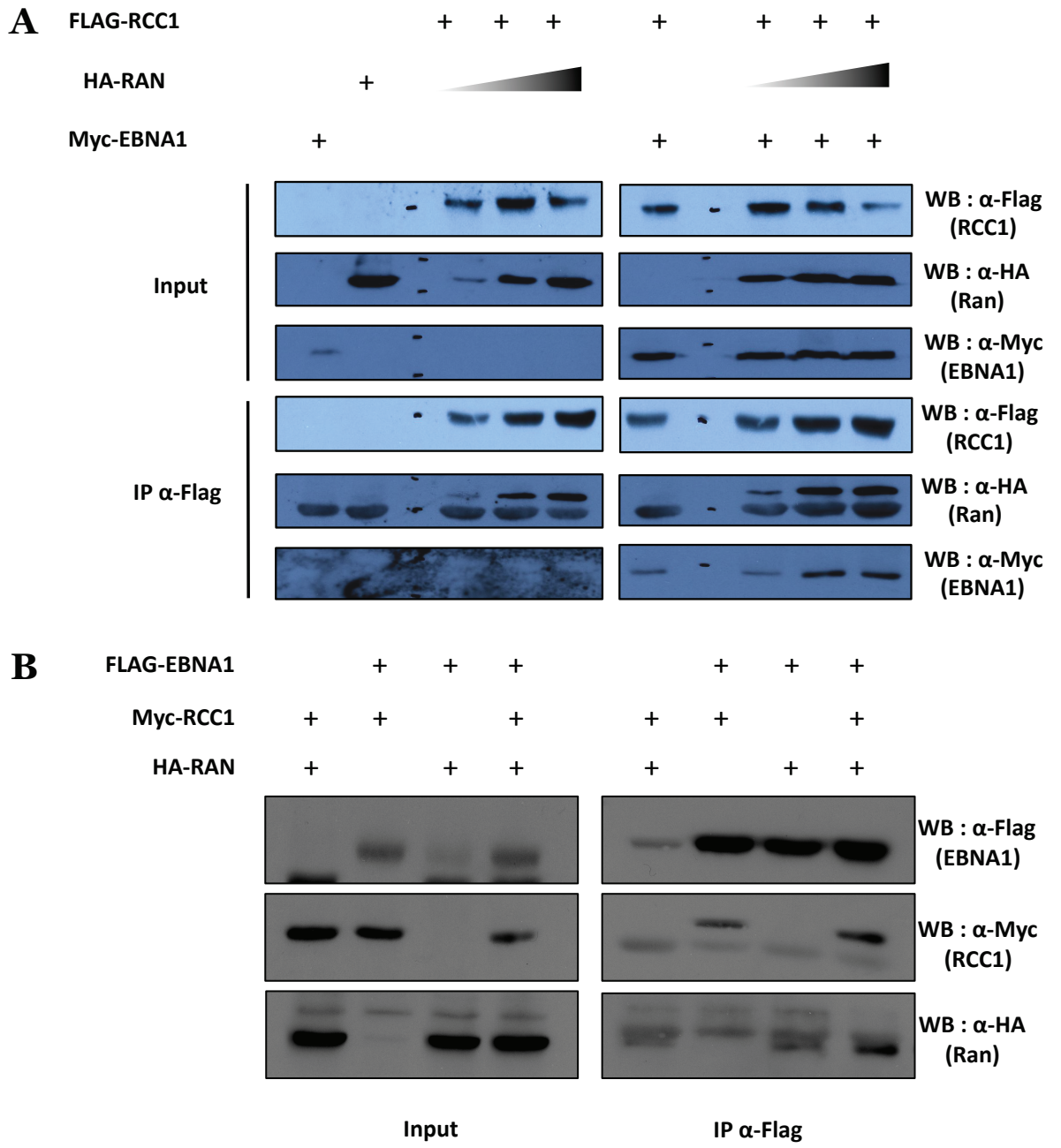


Figure 23 : EBNA1 n'empêche pas l'interaction entre Ran et RCC1

Des cellules HeLa ont été transfectés par des plasmides d'expressions codant pour les protéine (A) Flag-RCC1, Myc-EBNA1 et des quantités croissantes d'HA-Ran ou (B) Flag-EBNA1, Myc-RCC1 et HA-Ran. Une immunoprécipitation à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'épitiope Flag est réalisée, les complexes immunoprécipités sont révélés par westernblot.

4. EBNA1 n'interagit pas avec des nucléosomes reconstitués

En 2013, Kanda *et al.* démontrent que des peptides dérivés de la région LR1 sont capables d'interagir directement avec des nucléosomes reconstitués *in vitro* (Kanda *et al.* 2013). Afin de vérifier si cette capacité d'interaction est conservée dans le cas de la protéine entière, nous avons purifié la protéine 6xHisEBNA1 dans un système procaryote. Nous avons incubé des quantités croissantes de la protéine 6xHis-EBNA1 purifiée avec des nucléosomes reconstitués *in vitro* ou le fragment d'ADN utilisé pour la reconstitution des nucléosomes (**figure 24-A**). La protéine EBNA1 purifiée n'induit aucun retard de migration de l'ADN nu ni des nucléosomes reconstitués. Ces résultats suggèrent que, dans le contexte de la protéine entière, les peptides préalablement identifiés comme interagissant avec des nucléosomes reconstitués ne sont (i) pas accessibles ou (ii) pas dans la bonne conformation. Ces résultats suggèrent également la nécessité d'un facteur cellulaire pour l'interaction d'EBNA1 avec les nucléosomes.

Comme RCC1 interagit directement avec les nucléosomes, nous avons ensuite étudié un recrutement possible d'EBNA1 sur des nucléosomes reconstitués en présence de RCC1. Comme le montre la **figure 24-B**, RCC1 induit comme attendu un retard de migration des nucléosomes ce qui démontre sa capacité d'interaction avec les nucléosomes. L'ajout de la protéine EBNA1 n'induit pas un retard plus important. En revanche, en présence de RCC1 et de quantité croissante d'EBNA1, on remarque que la quantité de nucléosome libre diminue progressivement. Ce résultat a également été obtenu dans une expérience similaire. Les conditions expérimentales de cette approche nécessitent d'être optimisées afin d'obtenir un résultat plus clair. En effet le retard de migration induit par RCC1 se présente sous la forme d'une trainée plus ou moins grande, ceci est vraisemblablement lié à la capacité de RCC1 d'interagir avec elle-même et donc de former des oligomères de nucléosomes. Dans cette condition, il est difficile d'observer un retard sur gel pouvant être induit par le recrutement d'EBNA1. Par ailleurs, le recrutement d'EBNA1 sur les nucléosomes pourrait nécessiter un autre partenaire en plus de RCC1 ou encore des modifications post-traductionnelles, absentes de la protéine produite dans le système procaryote.

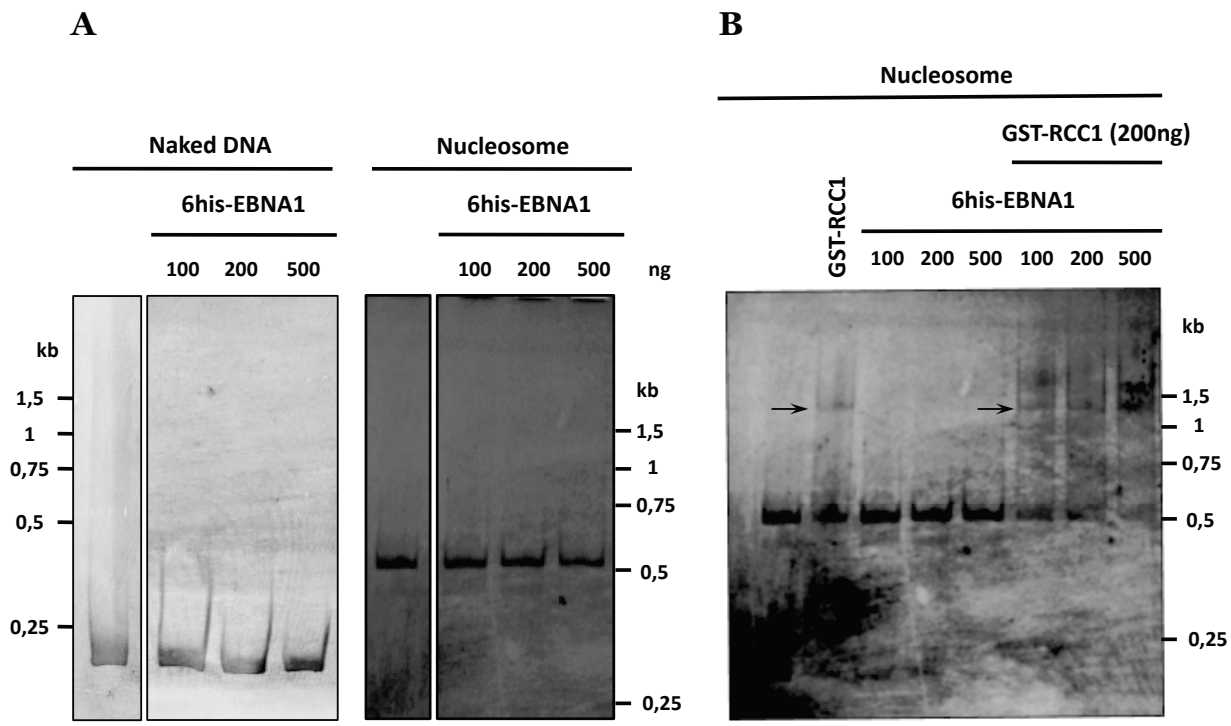


Figure 24 : EBNA1 n'interagit pas avec des nucléosomes reconstitués

Des quantités croissantes de la protéine 6xHis-EBNA1 purifiée sont incubées en présence d'ADN nu ou de nucléosomes reconstitués (A) en absence ou (B) en présence d'une forme purifiée de la protéine GST-RCC1. Les complexes sont révélés après migration en gel de polyacrylamide non dénaturant et marquage au SyBRGreen.

III. Essais de maintien de plasmides dérivés du génome d'EBV possédant l'*oriP*

Le plasmide pCEP4 possède la capacité de se maintenir au sein d'une culture cellulaire de manière autonome. Ce plasmide contient la région *oriP* du virus d'Epstein-Barr, le gène codant pour la protéine EBNA1, le gène de la GFP permettant le suivi des cellules transfectées et un gène de résistance à l'hygromycine. Les résultats de la puce peptidique nous ont permis d'identifier de nombreux domaines d'interaction d'EBNA1 pour RCC1, notamment le domaine core (aa 413 à 420). L'ancrage de la protéine EBNA1 aux chromosomes mitotiques semble indépendant de ce domaine comme le montrent de nombreuses études. Cependant, ce domaine est une région majeure d'interaction avec la queue N-terminale de RCC1, on peut donc supposer que ce domaine permet la stabilisation de l'interaction avec la protéine EBNA1 entière. Par ailleurs, aucun autre facteur, excepté RCC1, n'a été décrit pour interagir avec ce domaine. Enfin, il est impossible d'inhiber la protéine RCC1 à long terme, de par son rôle clé dans le transport nucléo-cytoplasmique et lors de la mitose l'inhibition de RCC1 induit rapidement la mort cellulaire. Nous avons ainsi étudié l'impact du domaine core, spécifique

pour l'interaction avec RCC1, sur le maintien d'un plasmide pCEP4. Pour cela, nous avons suivi le maintien d'un plasmide pCEP4-EBNA1 et d'un plasmide pCEP4 pour lequel la région core de la protéine EBNA1 a été retirée (pCEP4-EBNA1Δcore ; **figure 25**). Par ailleurs, nous testons actuellement l'interaction entre EBNA1Δcore et RCC1 par co-immunoprécipitation mais également par FRET.

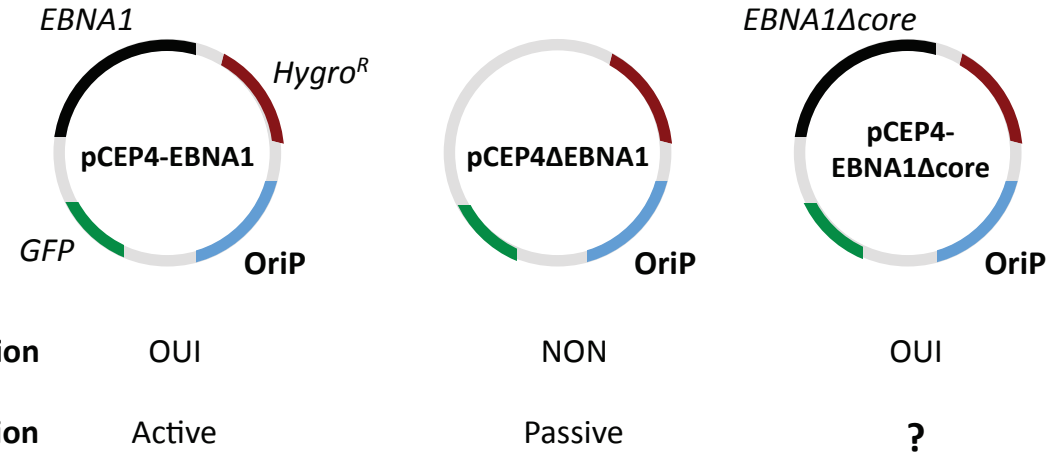


Figure 25 : Schéma des plasmides pCEP4-EBNA1, pCEP4ΔEBNA1 et pCEP4EBNA1Δcore

1. L'absence de sélection conduit à une perte rapide des plasmides transfectés

Afin d'étudier le maintien des plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore, ces plasmides ont été transfectés dans des cellules HeLa. Le maintien des plasmides est ensuite suivi par extraction de l'ADN et qPCR (amorces sur le plasmide pCEP4 et sur le gène de la β-globine comme contrôle). Le plasmide pCEP4ΔEBNA1 utilisé en contrôle négatif n'est pas répliqué et ségrège passivement.

Le suivi du maintien, en absence de sélection, montre une diminution rapide et similaire de la quantité de plasmides pour chacune des constructions, suggérant que le mécanisme de maintien ne permet pas, à lui seul, la persistance des plasmides à un niveau élévé. Ceci s'observe également par le faible pourcentage de cellules GFP positives 7 jours après transfection (**figure 26**). Enfin, l'ajout d'hygromycine 15 jours après transfection induit une mortalité massive de la culture cellulaire, quelques clones cellulaires émergent après 10 jours de culture pour les plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore (mais pas pour pCEP4-ΔEBNA1). L'absence de colonie pour le plasmide pCEP4-ΔEBNA1 démontre qu'il n'y a pas eu de phénomène intégratif permettant son maintien. Ainsi, il est probable que ces colonies résultent d'un maintien marginal des plasmides plutôt que d'un phénomène intégratif.

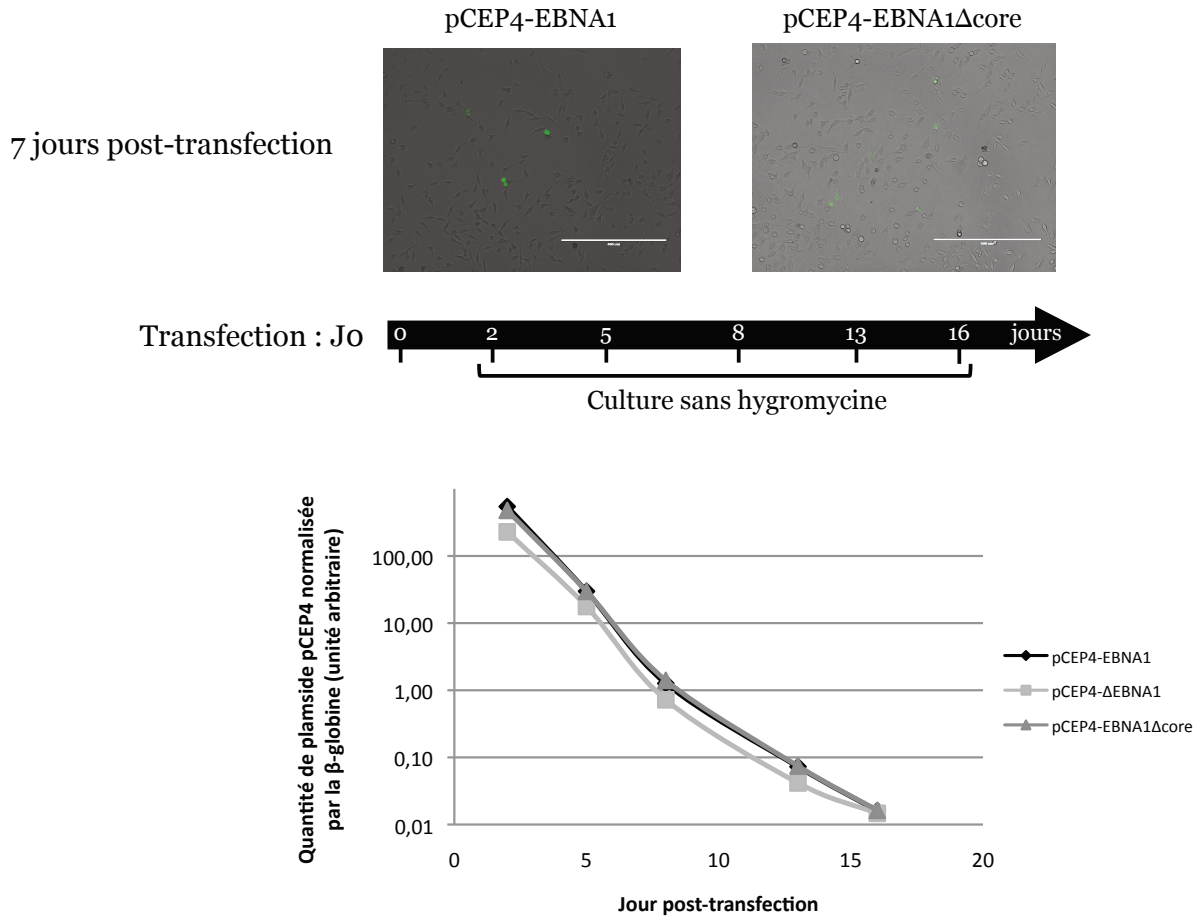


Figure 26 : Les dérivés du plasmide pCEP4 se maintiennent avec la même efficacité en absence de sélection

Les plasmides pCEP4-EBNA1, pCEP4ΔEBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore sont transfectés dans des cellules HeLa. Le maintien des plasmides a été suivi pendant 16 jours après la transfection par extraction de l'ADN et qPCR.

2. La pression de selection n'induit pas un meilleur maintien des épisomes viraux

Comme précédemment, nous avons transfecté les cellules par les différentes versions du plasmides pCEP4. 48 h après transfection, les cellules ont été mises sous sélection hygromycine pendant 11 jours, le temps d'obtenir une culture cellulaire avec un minimum de mortalité. Comme le montrent les images **figure 27**, dès 5 jours après sélection, des colonies GFP^+ sont observables dans le cas des plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore. Des colonies issues des cellules transfectées par le plasmide pCEP-ΔEBNA1 apparaissent environ 20 à 30 jours après le début de la sélection, vraisemblablement liées à des évènements d'intégration. 13 jours post-transfection (11 jours de sélection), les cultures cellulaires sont séparées en deux, une culture avec hygromycine et l'autre sans. Le maintien des plasmides est ensuite suivi au cours du temps par qPCR. De manière surprenante, le traitement continu des cellules par l'hygromycine ne permet pas un meilleur maintien du nombre de plasmides

par rapport aux cellules cultivées sans hygromycine, que cela soit pour pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore (**figure 27)**. Par ailleurs, l'ajout d'hygromycine 20 jours après la levée de la sélection induit une mortalité générale de la culture cellulaire et l'apparition de quelques colonies 10 à 15 jours après. Ces données sont cohérentes avec celles obtenues par Shannon-Lowe *et al.* (Shannon-Lowe *et al.* 2009). Le système *oriP*-EBNA1 ne permet pas un maintien stable d'un plasmide sans sélection, de plus, malgré une pression de sélection, les plasmides ne se maintiennent pas dans des quantités élevées. La délétion du domaine core n'affecte pas la capacité du plasmide pCEP4 à se maintenir dans une culture cellulaire en présence d'hygromycine.

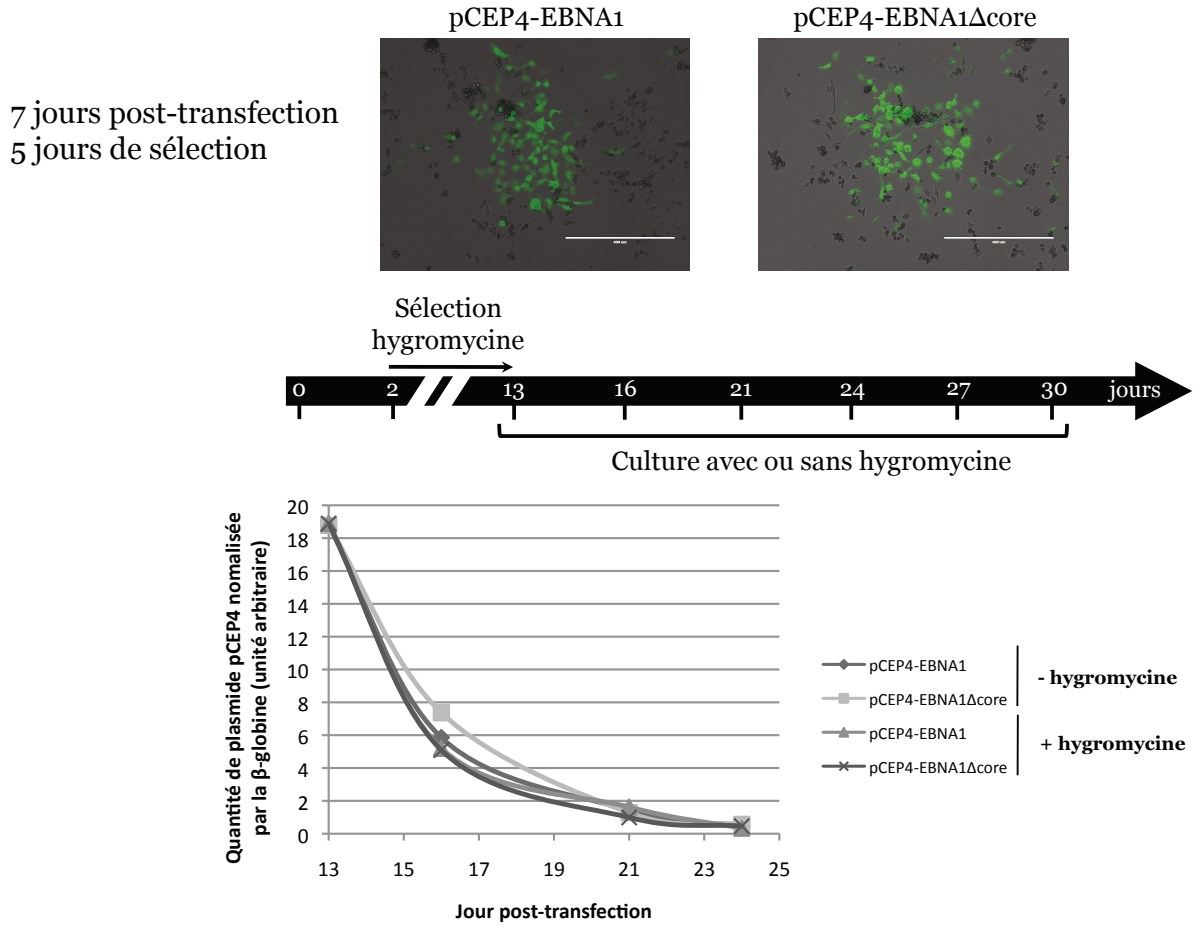


Figure 27 : La présence d'hygromycine n'induit pas un meilleur maintein des plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore

Les plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4EBNA1Δ-core sont transfectées dans des cellules HeLa. Deux jours après transfections, les cellules sont cultivées en présence d'hygromycine pendant 11 jours puis cultivées en absence, pour une moitié, ou en présence, pour l'autre moitié de la culture, d'hygromycine pendant 11 jours. La quantité de plasmides au cours du temps est évaluée par qPCR.

3. Le domaine core n'a pas d'effet sur l'efficacité de maintien du plasmide pCEP4

La capacité de maintien du plasmide pCEP4-EBNA1Δcore étant la même que pour le plasmide pCEP4-EBNA1, nous avons voulu analyser si l'efficacité de maintien au sein d'une culture transfectée par ces plasmides, sous sélection, était différente. Dans notre expérience, nous considérons que l'efficacité de maintien est proportionnelle à la résistance à l'hygromycine : l'altération du maintien conduira à une diminution de la résistance face à l'hygromycine et donc une prolifération ralentie. Nous évaluons la vitesse de prolifération en analysant la taille des colonies de cellules sous sélection par l'hygromycine. Pour cela, nous avons transfecté ces deux plasmides, en duplicat, dans des cellules HeLa, selectionné et amplifié les cellules transfectées par l'ajout d'hygromycine. Après 6 jours de sélection, nous avons levé la sélection et à chaque passage 10^5 cellules ont été mises en culture avec de l'hygromycine pendant 10 jours. Au terme des 10 jours, les cellules sont colorées au crystal violet et la taille des colonies est évaluée à l'aide du logiciel ImageJ. Comme le montre la **figure 28**, la taille des colonie ne varie pas au cours du temps et il n'y a pas de différence entre les cellules transfectées par pCEP4-EBNA1 de celles transfectées par pCEP4-EBNA1Δcore. La délétion du domaine core ne semble pas influencer la capacité ni l'efficacité de maintien d'un plasmide dérivé du génome viral.

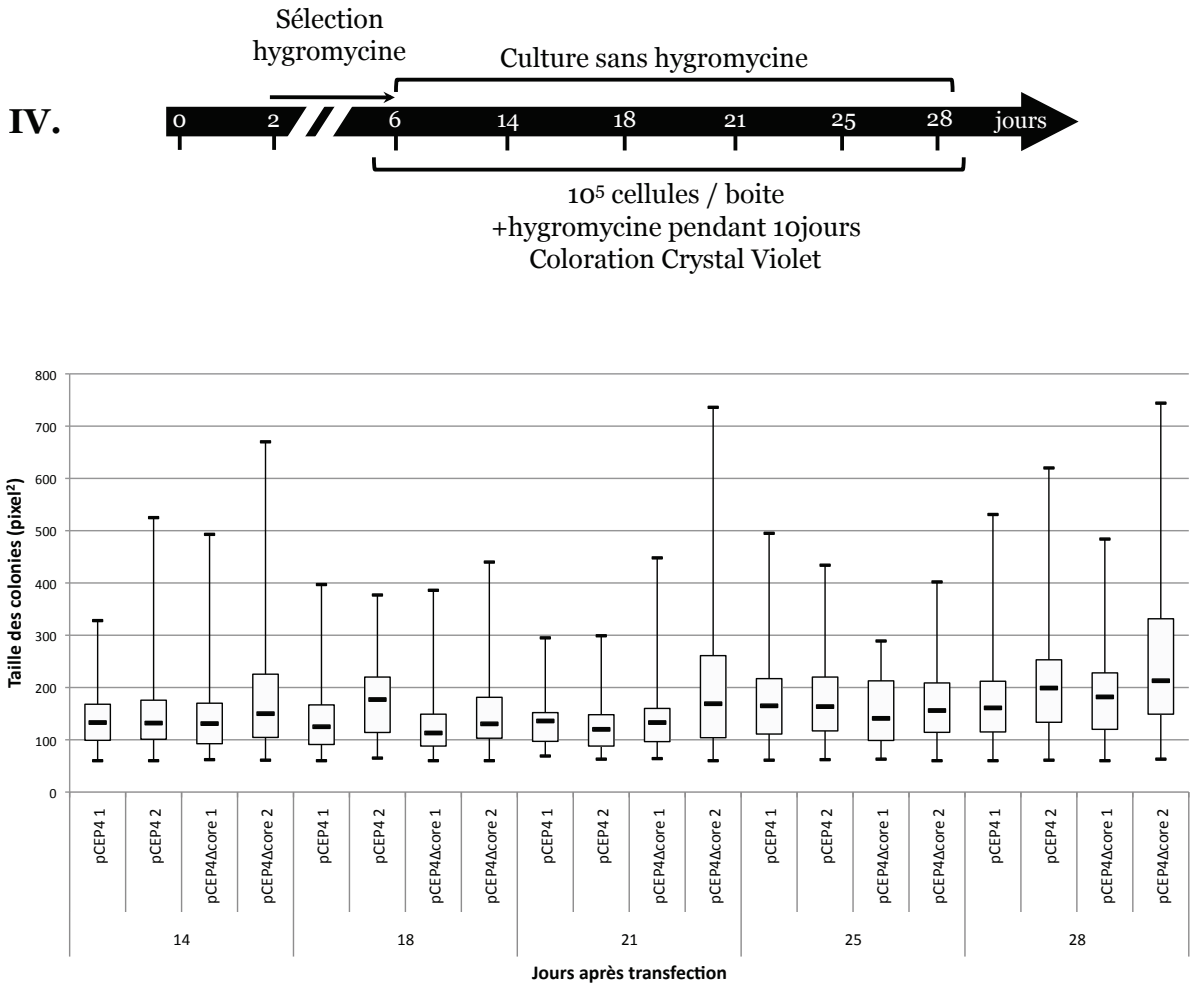


Figure 28 : L'efficacité de maintien des plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore est la même

Les plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore sont transfectés en duplicat dans des cellules HeLa. 2 jours après transfections les cellules sont cultivées en présence d'hygromycine pendant 4 jours puis, à chaque passage de la culture cellulaire, 10^5 cellules sont mises en culture en boite 10 cm en présence d'hygromycine pendant 10 jours. Au terme de ces 10 jours, les colonies cellulaires sont colorées au crystal violet et leurs tailles est évaluées à l'aide du logiciel ImageJ. La taille des colonies est représentée à l'aide de boites à moustache représentant les valeurs maximales et minimales, le premier et le troisième quartiles (extrémités du rectangle) ainsi que la médiane (trait noir épais). Une taille minimale de 60 pixel² a été choisie afin d'exclure les poussières et les cellules seules.

Matériels et méthodes supplémentaires

1. Reconstitution de nucléosomes et retard sur gel

Les nucléosomes ont été produits selon le protocole publié par Dyer *et al.* (Dyer *et al.* 2004). Brièvement, les différentes histones composant l'octamère (H2A, H2B, H3 et H4) sont produites dans un modèle procaryote puis purifiées. Les octamères sont reconstitués en dialysant les histones contre un tampon de reconstitution. Le nucléosome est reconstitué en dialysant l'ADN (fragment '601' de 197 pb) avec les octamères d'histones. La formation des nucléosomes est contrôlée par migration sur un gel d'acrylamide en condition native et révélation par marquage de l'ADN au SYBRGreen. Pour analyser l'interaction d'EBNA1 et RCC1 avec les nucléosomes, les protéines purifiées 6xHis-EBNA1 et GST-RCC1 sont incubées, seules ou ensemble, en présence de 200 ng de nucléosomes ou d'une quantité équivalente d'ADN nue pendant 20min à température ambiante. La formation de complexes est révélée après migration sur un gel de polyacrylamide en condition native et coloration au SYBRGreen.

2. Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC)

Les vecteurs ORPHEE et EURYDICE, fournis par Philippe MANGEOT (CIRI), codent chacun pour une moitié de la protéine Coral-Hue (CH1 pour la partie N-terminale, CH2 pour la partie C-terminale). Les gènes codant pour les protéines EBNA1 et RCC1 ont été insérés à l'aide de la technologie Gateway en amont des séquences pour CH1 ou CH2. Des cellules HEK-293T ont été transfectées par différents couples de plasmides complémentaires (CH1+CH2). 48 h post-transfection, les cellules sont fixées en PFA 4 % et analysées par cytométrie en flux sur un FACSCALIBUR 4C (BD Biosciences).

3. Analyse du maintien des plasmides pCEP4

Les plasmides pCEP4-ΔEBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore ont été construits par mutagénèse dirigée à l'aide du kit QuickChange XL (Agilent) et vérifiés par séquençage. Des cellules HeLa ont été transfectées par les 3 dérivés du plasmide pCEP4. Le maintien des plasmides a été suivi pendant 2, 5, 8, 13 et 16 jours par qPCR après extraction de l'ADN (Machery Nagel-Nucleospin® Tissue). Pour le suivi du maintien du plasmide sous sélection, les cellules HeLa ont été transfectées par les 3 dérivés du plasmide pCEP4 et cultivées en présence d'hygromycine (150 µg/mL) pendant 13 jours. La culture est séparée en 2, l'une maintenue sous sélection hygromycine l'autre non.

Pour l'analyse de la vitesse de prolifération, les cellules transfectées sont diluées à raison de 100 000 cellules/boite de 10cm, traitées à l'hygromycine pendant 10 jours et colorées au crystal violet (Sigma-Aldrich®). Pour la coloration, les cellules sont fixées en paraformaldehyde 4 % puis colorées avec une solution de crystal violet à 0,1 %, diluée dans

de l'éthanol 20 %, pendant 15 min. Les boites sont rincées à l'eau ultrapure et séchées à température ambiante. Les boites sont scannées et la taille des colonies est mesurée à l'aide du logiciel ImageJ.

4. Liste des amorces et anticorps utilisés

Plasmide pCEP4-EBNA1Δcore :

5' CTGTAGGGGAAGCCGGTGGCCCAGATGG 3'

5' CCATCTGGGCCACCGGCTTCCCCTACAG 3'

Plasmide pCEP4ΔEBNA1 :

5' CTCCCTGTATTCACTGAGCGTCGTGTAACTTGTTAGGAGACGCCC 3'

5' GGGCGTCTCCTAACAAGTTACACGACGCTCAGTGAATACAGGGAG 3'

Amorces de qPCR :

β-globine :

5' CCCTTGGACCCAGAGGTTCT 3'

5' CGAGCACTTTCTTGCCATGA 3'

Anticorps :

α-HA : Sigma – H9658

α-RCC1 : Abcam - ab54600

Discussion

I. Mécanisme de recrutement de la protéine EBNA1 sur la chromatine mitotique

Le maintien, à long terme, de l'épisome viral au sein des cellules infectées est une caractéristique majeure des herpesvirus. Les stratégies de maintien employées sont diverses et varient notamment en fonction de la cellule infectée. L'infection de cellules quiescentes n'implique pas de mécanismes de réplication ou de ségrégation particuliers (cas de HSV1). À l'inverse, l'infection de cellules en prolifération nécessite un mécanisme actif de réplication ainsi qu'une ségrégation efficace du génome viral, ceci limitant la perte du génome viral au cours des divisions successives (cas de KSHV, EBV…). Dans le cas de KSHV et EBV, ces fonctions sont portées par 2 éléments viraux interagissant ensemble. Pour le virus d'Epstein-Barr, la région *oriP* située sur le génome viral et la protéine virale EBNA1 sont les deux facteurs viraux nécessaires et suffisants au maintien de l'épisome viral. La réplication et la ségrégation, étapes clés du maintien, nécessitent un ancrage aux chromosomes cellulaires. Cet ancrage implique l'interaction (i) du domaine N-terminal d'EBNA1 avec la chromatine et (ii) de son domaine C-terminal avec l'*oriP*. L'interaction entre EBNA1 et l'*oriP* est très bien caractérisée notamment depuis la résolution de la structure cristallographique de ce complexe en 1996. A l'inverse, l'interaction d'EBNA1 avec la chromatine cellulaire, notamment lors de la mitose, reste encore mal définie.

De nombreux travaux ont porté sur la compréhension de cette interaction sans apporter de réponse claire (Shire *et al.* 1999 ; Jourdan *et al.* 2012; Sears *et al.* 2004 ; Kanda *et al.* 2013). Ces travaux démontrent notamment la capacité de peptides dérivés du domaine LR1 à interagir avec l'ADN nu ou sous forme de nucléosome et la présence de domaines AT-Hook (GR1 et GR2) capables d'interagir avec des séquence dA-dT *in vitro*. Récemment Chakravorty et Sugden ont démontré que l'utilisation de la drogue Braco-19, interagissant spécifiquement avec les régions AT de l'ADN, inhibait le maintien de l'épisome d'EBV (Chakravorty and Sugden 2015) vraisemblablement en bloquant, en partie, l'interaction entre EBNA1 et la chromatine. Cependant, nous avons montré que les domaines AT-Hook ne sont pas indispensables pour l'ancrage de la protéine EBNA1 sur les chromosomes mitotiques. Ainsi, l'inhibition du maintien induite par la drogue Braco 19 est lié à l'inhibition de la réplication du génome viral. Enfin, la délétion de ces domaines abroge l'activité transcriptionnelle de la protéine EBNA1 liée à la présence de l'élément FR dans le promoteur cible. Ces deux domaines sont connus pour interagir avec de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans la régulation de la transcription par EBNA1 (NAP1, P32/TAP et TAF-Iβ) ce qui expliquerait cette inhibition de la transcription.

Un peptide dérivé de la région LR1 a été décrit pour interagir directement avec des nucléosomes reconstitués (Kanda *et al.* 2013). Le peptide utilisé est riche en acides aminés

chargés positivement (arginine) qui pourraient interagir directement avec les charges négatives de l'ADN ou des poches acides des nucléosomes. Nos travaux démontrent que la protéine EBNA1 complète n'interagit pas avec des nucléosomes reconstitués ou de l'ADN nu. Ainsi, l'interaction d'EBNA1 avec les nucléosomes nécessiterait un autre facteur, facteur qui pourrait recruter et induire un changement de conformation d'EBNA1, permettant au domaine LR1 d'interagir avec les nucléosomes.

Afin d'identifier les partenaires impliqués dans l'interaction d'EBNA1 avec la chromatine cellulaire, nous avons effectué un crible deux-hybrides. Sur l'ensemble des partenaires potentiels d'EBNA1 identifiés, la protéine RCC1 apparaissait comme la protéine la plus prometteuse. RCC1 interagit directement avec la chromatine cellulaire, à la fois avec les histones H2A/H2B mais également avec le squelette phosphate de l'ADN. Cette interaction, dynamique, est stabilisée durant la mitose et permet, entre autres, la mise en place du fuseau mitotique. Cette stabilisation sur la chromatine en mitose représente une plateforme d'interaction de choix pour EBNA1 afin d'interagir avec la chromatine. Nous avons validé l'interaction entre EBNA1 et RCC1 en exploitant diverses approches : co-immunoprécipitation, GST-Pulldown, BiFC, puce peptidique. Grâce à ces approches nous avons caractérisé les domaines d'interactions entre ces deux protéines. De manière intéressante, les domaines d'EBNA1 impliqués dans l'interaction avec RCC1 sont les mêmes que ceux impliqués dans l'interaction avec la chromatine, à savoir les régions LR1 et LR2. Concernant la protéine RCC1, le domaine N-terminal (aa 1 à 20) est nécessaire pour l'interaction entre les deux partenaires comme le montrent nos résultats de GST-Pulldown. L'incubation d'une puce couvrant l'intégralité de la séquence nucléotidique de la protéine EBNA1 sous forme de polypetides de 25 acides aminés (**figures 5 et 6** du papier) avec la protéine GST-RCC1 purifiée nous a permis (i) de valider les régions d'interaction identifiées par GST-Pulldown, ces régions coïncidant très bien avec les domaines d'interaction pour la chromatine décrits pour EBNA1, (ii) d'identifier deux domaines supplémentaires interagissant avec RCC1 : la queue acide C-terminale et un domaine situé entre les acides aminés 413 à 420 (domaine core), et (iii) d'analyser plus précisément le rôle de la queue N-terminale de RCC1 dans l'interaction avec ces différents domaines. Le domaine core n'a jamais été décrit comme étant impliqué dans une interaction avec un autre facteur ou encore une fonction de la protéine ; le rôle de la queue acide a été analysé par Ceccarelli *et al.* : ils démontrent que la délétion de ce domaine diminue l'efficacité de la réplication de moitié sans affecter le maintien à long terme de l'épisome viral (Ceccarelli and Frappier 2000).

Concernant la queue N-terminale de RCC1, l'incubation de cette même puce avec la protéine GST-RCC1.1-20 montre une interaction forte avec le domaine core et plus faiblement avec la queue acide. L'analyse approfondie des acides aminés du domaine core impliqués dans l'interaction avec la queue N-terminale révèle un rôle essentiel des acides

aminés chargés négativement pour l'interaction. La queue N-terminale possède 6 acides aminés chargés positivement et 1 chargé négativement. La phénylalanine en position 415 joue également un rôle majeur dans l'interaction. Ainsi il est probable que l'interaction entre le domaine core et la région amino-terminale de RCC1 se fasse au travers d'interactions électrostatiques. L'incubation avec la protéine GST-RCC1Δ1-20 montre un profil d'interaction similaire à la protéine entière mais d'une intensité bien moindre. Nos expériences de GST-Pulldown montrent que la protéine GST-RCC1Δ1-20 n'interagit plus avec EBNA1, cependant l'approche par la puce peptidique indique la présence d'interactions, certes plus faibles. Ces résultats suggèrent que la queue N-terminale de RCC1 permet de stabiliser l'interaction entre EBNA1 et RCC1 et que cette interaction implique également des domaines situés sur l'hélice de RCC1.

La structure cristallographique de RCC1 et la structure prédictive de la protéine EBNA1 nous permettent, à l'aide de nos données, de suggérer un modèle d'interaction entre les deux protéines. Sur la structure prédictive d'EBNA1 monomérique, les régions LR1, LR2, le domaine core et la queue C-terminale acide sont situés du même côté de la protéine, la région LR1 étant la région la plus éloignée (**figure 13 page 51** et **figure 29-A**). Le coude reliant la partie N-terminale à la partie C-terminale de la protéine forme un espace ouvert. Ce coude contient le domaine core ainsi que la région LR2 et fait face à la queue acide. Ainsi, la queue N-terminale de RCC1 pourrait interagir avec l'ensemble de ces domaines en occupant l'espace libre au milieu du coude. Cette conformation permettrait également l'interaction entre EBNA1 (région LR1) et l'hélice de RCC1, sur la face opposée à la boucle d'interaction pour Ran. Cette conformation n'affecte vraisemblablement pas l'interaction entre Ran et RCC1 comme le montrent nos résultats de co-immunoprécipitation. Par ailleurs, la surexpression de Ran semble améliorer l'interaction entre EBNA1 et RCC1. Les travaux de Hao et Macara révèlent que l'interaction de Ran-GDP avec RCC1 modifierait la position de la queue N-terminale de RCC1, notamment que la queue N-terminale s'éloignerait de l'hélice pour interagir avec le nucléosome (Hao and Macara 2008). Il est possible que cette modification de conformation induite par Ran facilite l'interaction entre EBNA1 et RCC1. De manière surprenante, les domaines LR1 et LR2 seuls sont capables d'interagir avec la protéine RCC1 mais un mutant amputé du domaine LR2 n'interagit plus RCC1. Par ailleurs, ce même mutant ΔLR2 a été décrit pour n'interagir que partiellement avec la chromatine mitotique (Nayyar, Shire, and Frappier 2009). La délétion de ce domaine semble affecter profondément la fonction de la protéine EBNA1. Il est probable que ce domaine soit important pour une conformation correcte de la protéine, il est donc difficile d'exploiter ce mutant dans l'étude de la protéine EBNA1. Par ailleurs, si l'on considère l'homodimère d'EBNA1 en interaction avec l'*oriP*, les domaines LR1, LR2 et core se retrouvent exposés sur la face opposée au domaine d'interaction avec l'ADN (**figure 29-B**). Cette conformation permettrait l'ancrage de RCC1,

par la queue N-terminale, au travers d'une niche située entre les deux monomères d'EBNA1 et bordée par le domaine core. Cette conformation permettrait également l'interaction entre l'hélice de RCC1 et les régions LR1 et LR2 d'EBNA1. Dans cette conformation, la queue acide d'EBNA1 semble trop éloignée pour interagir avec RCC1.

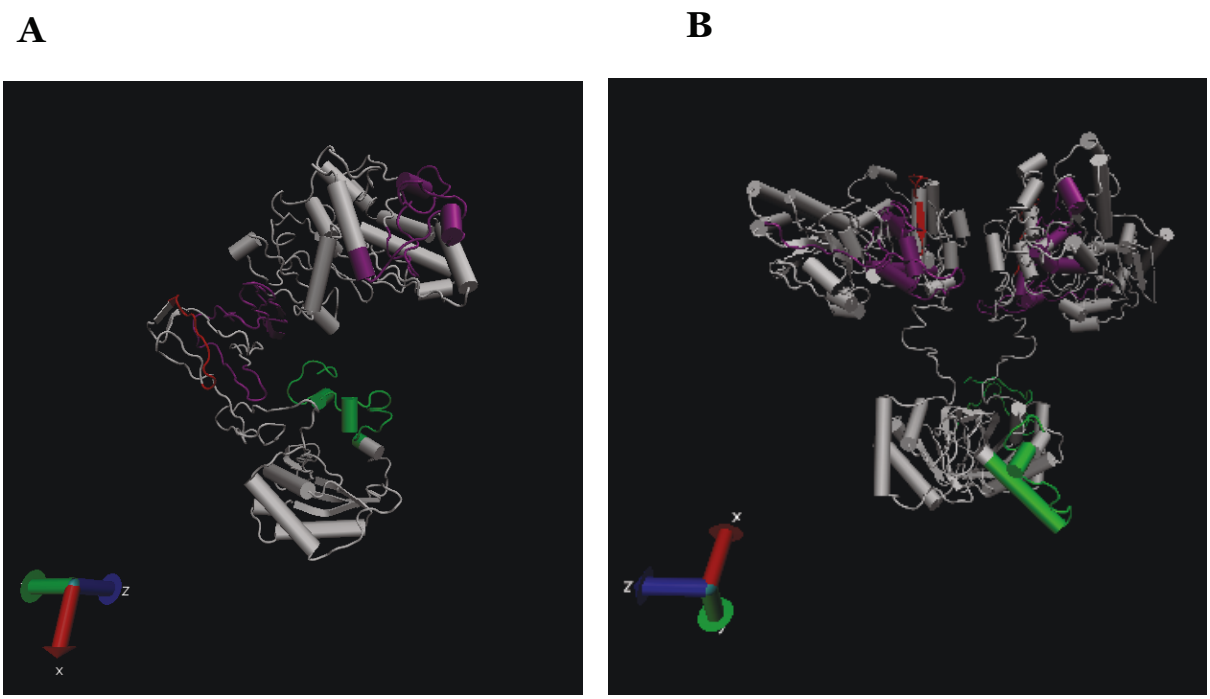


Figure 29 Régions d'interaction pour la protéine RCC1 représentées sur la structure prédictive de la protéine EBNA1 monomérique et dimérique (d'après Hussain *et al.* 2014)

(A) Forme monomérique et (B) forme dimérique de la protéine EBNA1. Violet : LR1 et LR2 ; Rouge : région core ; Vert : queue C-terminale acide

Afin d'étudier le rôle de cette interaction dans le maintien du génome viral, notamment le recrutement d'EBNA1 sur la chromatine mitotique, nous avons analysé deux aspects importants : (i) le recrutement de RCC1 sur l'*oriP* et (ii) l'interaction entre EBNA1 et RCC1 durant la mitose. (i) Le recrutement de la protéine RCC1 sur l'*oriP* a été analysé par ChIP en utilisant des couples d'amorces le long de l'*oriP*. La protéine RCC1 est recrutée sur les régions autours de l'*oriP*, plus particulièrement sur FR, en présence de la protéine EBNA1. (ii) Afin d'analyser l'interaction entre EBNA1 et RCC1 en mitose, nous avons exploité la technologie FRET. Les deux protéines interagissent peu durant la prophase, tandis qu'en métaphase un signal FRET positif est observé. L'ensemble de nos résultats suggère que la protéine RCC1 est impliquée dans le recrutement du complexe EBNA1-génome viral sur le chromosome mitotique, plus spécifiquement en métaphase.

En phase G2, les génomes viraux répliqués sont le plus souvent retrouvés au même endroit, confondus en un seul point détecté par la méthode de FISH. La présence des cohésines permettrait de maintenir les épisomes, ancrés à la chromatine par EBNA1, sur

chaque chromatide sœur. À la transition métaphase-anaphase, les cohésines sont dégradées ce qui permet la séparation des chromatides sœurs et leur migration à chaque pôle de la cellule. Bien que la protéine EBNA1 interagisse avec la chromatine en prophase, l'interaction avec la protéine RCC1 en métaphase permettrait de stabiliser les protéines EBNA1 associées à l'*oriP* sur la chromatine.

Le transport de la protéine EBNA1 est dépendant de l'importine α5 (Ito *et al.* 2000) et donc de la protéine Ran. En mitose, le gradient de Ran-GTP autour des chromosomes permet la mise en place du fuseau mitotique en dissociant les complexes importine-cargo. Il est vraisemblable que la fraction de protéines EBNA1 cytosoliques soit prise en charge par les importines et dirigée vers les chromosomes. Avant la transition métaphase-anaphase, l'échange du GDP pour un GTP de la protéine Ran ne peut avoir lieu que sur la chromatine, l'activité catalytique de RCC1 étant inhibée dans le cytosol par son interaction avec la protéine RanBP1. Le maximum d'interaction entre EBNA1 et RCC1 en métaphase pourrait traduire le recrutement d'EBNA1 sur la chromatine par RCC1 au stade où la concentration de Ran-GTP est la plus forte autour des chromosomes. Comme le montre la **figure 23** EBNA1 est capable d'interagir à la fois avec la protéine RCC1 et Ran. De plus les données de FRET en interphase montrent une interaction entre RCC1 et EBNA1 dans des régions proches de la membrane nucléaire, régions d'interaction pour Ran et RCC1. Ces résultats peuvent suggérer que dès son entrée dans le noyau, la protéine EBNA1 peut être prise en charge par RCC1 et qu'un phénomène similaire a lieu sur la chromatine mitotique.

Ainsi, à la lumière des données de la littérature et de nos résultats, il est probable que l'interaction entre EBNA1 et la chromatine cellulaire nécessite plusieurs facteurs cellulaires. L'interaction d'EBNA1 avec la chromatine suppose une première étape de recrutement et une seconde de stabilisation sur l'ADN. Étant donné que cette interaction est indirecte, le recrutement d'EBNA1 est vraisemblablement lié à un facteur cellulaire pour lequel l'interaction avec EBNA1 peut être transitoire. À la suite de ce recrutement la capacité des régions LR1 et LR2 à interagir avec (i) des séquences riche en AT (*via* les domaines AT-Hook), (ii) des nucléosomes (LR1) ainsi que (iii) des facteurs cellulaires, notamment HMGB2, hEBP2 et RCC1, permettrait de stabiliser l'interaction d'EBNA1 sur la chromatine. Il est vraisemblable que les protéines interagissant avec la région N-terminale d'EBNA1 aient une fonction proche, voir redondante, pour son ancrage à la chromatine. En effet, l'inhibition d'HMGB2 n'a pas d'effet sur la localisation aux chromosomes mitotiques d'EBNA1 ni sur le maintien de l'épisome viral mais affecte la stabilité d'EBNA1 aux chromosomes. De manière similaire, la délétion des domaines AT-hook d'EBNA1 ne modifie pas sa localisation en mitose malgré sa perte d'interaction avec RCC1.

Il est intéressant de noter que l'un des mécanismes d'interaction de la protéine LANA avec la chromatine est similaire à celui de la protéine RCC1. Ces deux protéines exploitent la

présence de poches acide présentes sur les nucléosomes, il a notamment été décrit qu'elles sont en compétition pour l'interaction avec le nucléosome (Kalashnikova *et al.* 2013). Ainsi, bien qu'ayant évolué différemment, LANA et EBNA1 exploitent un mécanisme d'interaction avec les nucléosomes similaire à la différence que pour EBNA1 ce mécanisme est indirect.

Il serait intéressant d'analyser le comportement des mutants EBNA1ΔRG et -Δcore quant à leurs interactions avec EBNA1. De manière similaire à l'étude sur HMGB2, il est envisagé d'analyser la dynamique de la protéine EBNA1 sur la chromatine, en mitose et en interphase, en absence de RCC1. Pour cela, une approche par FRAP sera développée (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) en exploitant la lignée de hamster tsBN2 pour laquelle la protéine RCC1 est dégradée à température restrictive. Enfin, nous souhaitons développer un système d'inhibition par compétition de l'interaction entre EBNA1 et RCC1. Nous supposons que la surexpression de la queue N-terminale de RCC1, structure clé dans l'interaction avec EBNA1, empêcherait la protéine EBNA1 d'interagir avec RCC1 endogène. Ce système nous permettrait d'analyser plus directement le rôle de RCC1 dans le maintien du génome viral au cours du temps mais aussi pour d'autres mécanismes pour lesquels l'interaction EBNA1-RCC1 pourrait intervenir.

II. Efficacité de maintien de l'épisome viral

Nous avons en particulier analysé le rôle du domaine core (aa 413-420) dans le maintien d'un plasmide autonome dérivé du génome viral, portant l'*oriP* et le gène codant la protéine EBNA1 (plasmide pCEP4), ce domaine n'ayant jamais été impliqué dans une interaction avec un autre facteur que RCC1. En effet, dans le but d'analyser l'implication de l'interaction entre EBNA1 et RCC1 dans le maintien de l'épisome viral, nous ne pouvons inhiber la protéine RCC1, notamment par shARN. Une telle inhibition induit des défauts de ségrégation des chromosomes durant la mitose et elle n'est pas viable pour les cellules. En effet, la survie de la lignée tsBN2, thermosensible pour RCC1, à température restrictive ne dépasse pas les 36 h. Alors que le plasmide pCEP4ΔEBNA1 n'est pas capable de se maintenir sous forme épisomique, les plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore se maintiennent avec la même efficacité. Il est important de considérer que le plasmide pCEP4 est une version très simplifiée de l'épisome viral. Ainsi, il serait plus pertinent d'analyser la capacité de transformation et de maintien d'un virus EBV recombinant, dans un modèle de lymphocyte B, pour lequel le domaine core de la protéine EBNA1 aura été amputé.

Bien que ces expériences ne nous aient pas permis de détecter de différence entre les protéine EBNA1 et EBNA1Δcore, elles nous ont permis de faire quelques observations intéressantes sur les spécificités de maintien des plasmides pCEP4. La cinétique de décroissance des plasmides au cours du temps, que cela soit avec ou sans traitement par l'hygromycine, est la même. Rapidement après la transfection, le nombre de plasmides

décroit rapidement, environ 50 % en 2-3 jours. L'absence de sélection n'entraine cependant pas la perte définitive de ces plasmides. En effet 15 jours après la transfection, l'ajout d'hygromycine permet l'émergence de colonies résistantes dans le cas des plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore. Ces plasmides sont capables de se maintenir de manière marginale dans une population cellulaire sans pour autant prendre le pas sur la population générale. La mise en place d'une sélection par l'hygromycine 2 jours après la transfection induit l'émergence de colonies après 5 jours pour les plasmides pCEP4-EBNA1 et pCEP4-EBNA1Δcore et à plus long terme la mise en place d'une culture entièrement résistante à l'hygromycine. De manière intéressante, le traitement continu avec l'hygromycine n'induit pas un meilleur maintien du nombre de plasmides comparé à une culture sans hygromycine. Cependant, alors que la culture maintenue en présence d'hygromycine ne présente qu'une très faible mortalité cellulaire, similaire à une culture sans sélection, la reprise de la sélection 20 jours après son arrêt induit une forte mortalité et l'apparition de quelques colonies, cela après plusieurs jours de culture. Ces données démontrent que la présence d'une sélection permettrait le maintien de l'épisome viral de manière ubiquitaire dans une culture cellulaire. La levée ou l'absence d'une pression de sélection induit l'émergence d'une population négative pour l'épisome sans que celui-ci ne disparaisse complètement et cela après 20 jours sans sélection. Par ailleurs, la diminution importante du nombre de plasmides démontre que le système EBNA1-*oriP* ne permet pas un maintien élevé un nombre de plasmides par cellule mais plus le maintien d'une quantité minimale requise contre la sélection par l'hygromycine.

Remis dans un contexte d'infection chez l'homme, l'activation du lymphocyte B par EBV induit une étape d'hyperprolifération précédant la mise en place du centre germinatif. Il est possible que lors de cette étape de prolifération, certaines cellules n'héritent pas d'un épisome viral et ainsi soient incapables de poursuivre leur maturation. En absence de facteurs viraux, ces cellules sont destinées à la mort par apoptose ou sont la cible du système immunitaire. De manière similaire, dans des lignées de lymphome de Burkitt, l'apoptose est induite dès lors que le génome viral est perdu. La dépendance au virus de plusieurs lignées EBV^+ a notamment été démontré en 2011 par Vereide *et al.* (Vereide and Sugden 2011). La présence du virus au sein de BL pallierait l'absence de mutation pouvant conduire au développement d'un état tumoral, ce qui expliquerait une fréquence de ces mutations plus élevée dans des lymphomes EBV^- comparés aux lymphomes EBV^+. Dans ces situations, les cellules sont dépendantes des facteurs viraux ce qui représenterait la pression de sélection pour le maintien du génome viral, sans qui elles ne peuvent survivre.

Un modèle mathématique analysant l'efficacité de maintien du génome viral au cours des divisions a été développé par Nanbo *et al.* (Nanbo, Sugden, and Sugden 2007). Il reproduit fidèlement les résultats expérimentaux : une diminution rapide du nombre d'épisomes aux cours du temps. Cependant, bien que ce modèle considère un taux de

maintien de 88 % (relatif à l'efficacité de ségrégation observée dans leur étude), les auteurs ne prennent pas en compte l'effet du virus sur la survie et la prolifération cellulaire. Il existe une grande variabilité du nombre d'épisomes viraux entre les lignées cellulaires mais également au sein d'une même lignée. Des travaux, non publiés, démontrent que des clones cellulaires issus de la lignée Raji tendent à maintenir la même quantité d'épisomes au cours du temps (communication de V. Maréchal). Ce nombre constant d'épisomes représenterait un optimum nécessaire à la croissance de ce clone, traduisant l'effet positif du virus sur la prolifération cellulaire.

III. EBNA1-RCC1 dans le processus apoptotique

Nos données supportent un rôle de RCC1 dans le maintien du génome viral. Cependant l'interaction entre EBNA1 et RCC1 pourrait être impliquée dans d'autres processus ou mécanismes de régulation. RCC1 est un facteur clé pour de nombreux processus cellulaires comme le transport nucléo-cytoplasmique ainsi que le bon déroulement de la mitose. L'interaction entre EBNA1 et RCC1 pourrait altérer l'une de ces fonctions.

Nos travaux démontrent qu'EBNA1 interagit avec la protéine Ran et cela vraisemblablement par son interaction avec RCC1, et que l'interaction entre EBNA1 et RCC1 en interphase se fait majoritairement à la périphérie du noyau, zone où l'activité catalytique de RCC1 est la plus intense. De plus, d'après les données de cristallographie, l'interaction d'EBNA1 avec RCC1 se ferait du côté opposé de l'interaction avec Ran sans pour autant empêcher l'interaction de RCC1 avec la chromatine. Il est connu que l'activité catalytique de RCC1 dépend de son interaction avec la chromatine. Il serait intéressant d'analyser si cette activité est modifiée en présence d'EBNA1 notamment dans un contexte apoptotique. En effet, le traitement de cellules HeLa par l'étoposide induit la phosphorylation de l'histone H2B ce qui immobilise RCC1 à la chromatine et bloque son activité catalytique (Wong *et al.* 2009). L'interaction avec EBNA1 permettrait de maintenir l'activité catalytique de RCC1 dans un contexte pro-apoptotique et, ainsi la survie de la cellule.

La synthèse des données de la littérature ainsi que notre étude ne permet toujours pas de définir un mécanisme clair d'interaction entre EBNA1 et la chromatine. Il semblerait que la protéine EBNA1, plus particulièrement la région N-terminale, interagisse avec de nombreux partenaires cellulaires ayant pour rôle de recruter et/ou stabiliser EBNA1 sur les chromosomes. Il est donc très difficile de définir précisément l'implication de chacun des facteurs dans leurs interactions avec EBNA1. Notre étude a permis d'identifier un nouveau partenaire d'EBNA1, la protéine RCC1 qui, au vu de nos données, est impliquée dans l'ancrage de la protéine EBNA1, associée à l'épisome viral, aux chromosomes mitotiques.

Références bibliographiques

Adams, A. 1987. “Replication of Latent Epstein-Barr Virus Genomes in Raji Cells.” *Journal of Virology* 61 (5): 1743–46.

Aiyar, Ashok, Siddhesh Aras, Amber Washington, Gyanendra Singh, and Ronald B Luftig. 2009. “Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 Modulates Replication of oriP-Plasmids by Impeding Replication and Transcription Fork Migration through the Family of Repeats.” *Virology Journal* 6 (March): 29. doi:10.1186/1743-422X-6-29.

Alfieri, C., M. Birkenbach, and E. Kieff. 1991. “Early Events in Epstein-Barr Virus Infection of Human B Lymphocytes.” *Virology* 181 (2): 595–608.

Allday, M. J., and A. J. MacGillivray. 1985. “Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA): Size Polymorphism of EBNA 1.” *Journal of General Virology* 66 (7): 1595–1600. doi:10.1099/0022-1317-66-7-1595.

Altieri, Dario C. 2015. “Survivin – The Inconvenient IAP.” *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Mechanisms and differentiation of cell death & The Inhibitors of Apoptosis, 39 (March): 91–96. doi:10.1016/j.semcdb.2014.12.007.

Altmann, Markus, and Wolfgang Hammerschmidt. 2005. “Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis.” *PLoS Biol* 3 (12): e404. doi:10.1371/journal.pbio.0030404.

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.” *Journal of Virology* 65 (3): 1466–78.

Ambinder, R. F., W. A. Shah, D. R. Rawlins, G. S. Hayward, and S. D. Hayward. 1990. “Definition of the Sequence Requirements for Binding of the EBNA-1 Protein to Its Palindromic Target Sites in Epstein-Barr Virus DNA.” *Journal of Virology* 64 (5): 2369–79.

Apcher, Sebastien, Chrysoula Daskalogianni, Benedicte Manoury, and Robin Fåhraeus. 2010. “Epstein Barr Virus-Encoded EBNA1 Interference with MHC Class I Antigen Presentation Reveals a Close Correlation between mRNA Translation Initiation and Antigen Presentation.” *PLoS Pathog* 6 (10): e1001151. doi:10.1371/journal.ppat.1001151.

Apcher, Sebastien, Anastassia Komarova, Chrysoula Daskalogianni, Yili Yin, Laurence Malbert-Colas, and Robin Fåhraeus. 2009. “mRNA Translation Regulation by the Gly-Ala Repeat of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1.” *Journal of Virology* 83 (3): 1289–98. doi:10.1128/JVI.01369-08.

Arnaoutov, Alexei, Yoshiaki Azuma, Katharina Ribbeck, Jomon Joseph, Yekaterina Boyarchuk, Tatiana Karpova, James McNally, and Mary Dasso. 2005. “Crm1 Is a Mitotic Effector of Ran-GTP in Somatic Cells.” *Nature Cell Biology* 7 (6): 626–32. doi:10.1038/ncb1263.

Askjaer, Peter, Vincent Galy, Eva Hannak, and Iain W. Mattaj. 2002. “Ran GTPase Cycle and Importins Alpha and Beta Are Essential for Spindle Formation and Nuclear Envelope Assembly in Living Caenorhabditis Elegans Embryos.” *Molecular Biology of the Cell* 13 (12): 4355–70. doi:10.1091/mbc.E02-06-0346.

Aubry, Valentin, Fabrice Mure, Bernard Mariamé, Thibaut Deschamps, Lucjan S. Wyrwicz, Evelyne Manet, and Henri Gruffat. 2014. “Epstein-Barr Virus Late Gene

Transcription Depends on the Assembly of a Virus-Specific Preinitiation Complex." *Journal of Virology* 88 (21): 12825–38. doi:10.1128/JVI.02139-14.

Avolio-Hunter, Tina M., Peter N. Lewis, and Lori Frappier. 2001. "Epstein–Barr Nuclear Antigen 1 Binds and Destabilizes Nucleosomes at the Viral Origin of Latent DNA Replication." *Nucleic Acids Research* 29 (17): 3520–28. doi:10.1093/nar/29.17.3520.

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, and C. Séguin. 1984. "DNA Sequence and Expression of the B95-8 Epstein-Barr Virus Genome." *Nature* 310 (5974): 207–11.

Balfour, Henry H, Samantha K Dunmire, and Kristin A Hogquist. 2015. "Infectious Mononucleosis." *Clinical & Translational Immunology* 4 (2): e33. doi:10.1038/cti.2015.1.

Bamba, Chisa, Yves Bobinnec, Makoto Fukuda, and Eisuke Nishida. 2002. "The GTPase Ran Regulates Chromosome Positioning and Nuclear Envelope Assembly in Vivo." *Current Biology: CB* 12 (6): 503–7.

Barbera, Andrew J., Jayanth V. Chodaparambil, Brenna Kelley-Clarke, Vladimir Joukov, Johannes C. Walter, Karolin Luger, and Kenneth M. Kaye. 2006. "The Nucleosomal Surface as a Docking Station for Kaposi's Sarcoma Herpesvirus LANA." *Science* 311 (5762): 856–61. doi:10.1126/science.1120541.

Bazot, Quentin, Thibaut Deschamps, Lionel Tafforeau, Maha Siouda, Pascal Leblanc, Marie L. Harth-Hertle, Chantal Rabourdin-Combe, *et al.* 2014. "Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A Protein Regulates CDKN2B Transcription via Interaction with MIZ-1." *Nucleic Acids Research* 42 (15): 9700–9716. doi:10.1093/nar/gku697.

Berggren, Malin Å.M., Åsa Isaksson, Ulrica Larsson, Folke Nilsson, Ulla Nyström, Tor Ekman, Jane Löfvenmark, and Anne Ricksten. 2005. "Alternative EBNA1 Expression in Organ Transplant Patients." *Journal of Medical Virology* 76 (3): 378–85. doi:10.1002/jmv.20369.

Bierbaum, Martin, and Philippe I.H. Bastiaens. 2013a. "Cell Cycle-Dependent Binding Modes of the Ran Exchange Factor RCC1 to Chromatin." *Biophysical Journal* 104 (8): 1642–51. doi:10.1016/j.bpj.2013.03.024.

Bierbaum, Martin, and Philippe I. H. Bastiaens. 2013b. "Cell Cycle-Dependent Binding Modes of the Ran Exchange Factor RCC1 to Chromatin." *Biophysical Journal* 104 (8): 1642–51. doi:10.1016/j.bpj.2013.03.024.

Birkenbach, M., K. Josefsen, R. Yalamanchili, G. Lenoir, and E. Kieff. 1993. "Epstein-Barr Virus-Induced Genes: First Lymphocyte-Specific G Protein-Coupled Peptide Receptors." *Journal of Virology* 67 (4): 2209–20.

Blake, Neil, Steven Lee, Irina Redchenko, Wendy Thomas, Neil Steven, Alison Leese, Patty Steigerwald-Mullen, Michael G Kurilla, Lori Frappier, and Alan Rickinson. 1997. "Human CD8+ T Cell Responses to EBV EBNA1: HLA Class I Presentation of the (Gly-Ala)–Containing Protein Requires Exogenous Processing." *Immunity* 7 (6): 791–802. doi:10.1016/S1074-7613(00)80397-0.

Bochkarev, A., J. A. Barwell, R. A. Pfuetzner, E. Bochkareva, L. Frappier, and A. M. Edwards. 1996. "Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of the Epstein-Barr Virus Origin-Binding Protein, EBNA1, Bound to DNA." *Cell* 84: 791–800.

Bochkarev, Alexey, Jean A Barwell, Richard A Pfuetzner, Elena Bochkareva, Lori Frappier, and Aled M Edwards. 1996. "Crystal Structure of the DNA-Binding Domain of the Epstein–Barr Virus Origin-Binding Protein, EBNA1, Bound to DNA." *Cell* 84 (5): 791–800. doi:10.1016/S0092-8674(00)81056-9.

Borza, Corina M., and Lindsey M. Hutt-Fletcher. 2002. "Alternate Replication in B Cells and Epithelial Cells Switches Tropism of Epstein–Barr Virus." *Nature Medicine* 8 (6): 594–99. doi:10.1038/nm0602-594.

Bräuninger, Andreas, Roland Schmitz, Dörte Bechtel, Christoph Renné, Martin-Leo Hansmann, and Ralf Küppers. 2006. "Molecular Biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg Cells in Hodgkin's Lymphoma." *International Journal of Cancer* 118 (8): 1853–61. doi:10.1002/ijc.21716.

Burnet, FM, and SW Williams. 1939. "Herpes Simplex: New Point of View." *Medical Journal of Australia*, sec. 1.

Cai, X., A. Schafer, S. Lu, J. P. Bilello, R. C. Desrosiers, R. Edwards, N. Raab-Traub, and B. R. Cullen. 2006. "Epstein-Barr Virus microRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed." *PLoS Pathog* 2 (3): e23. doi:10.1371/journal.ppat.0020023.

Calarota, Sandra A., Antonella Chiesa, Paola Zelini, Giuditta Comolli, Lorenzo Minoli, and Fausto Baldanti. 2013. "Detection of Epstein–Barr Virus-Specific Memory CD4+T Cells Using a Peptide-Based Cultured Enzyme-Linked Immunospot Assay." *Immunology* 139 (4): 533–44. doi:10.1111/imm.12106.

Campo, Elias, Steven H. Swerdlow, Nancy L. Harris, Stefano Pileri, Harald Stein, and Elaine S. Jaffe. 2011. "The 2008 WHO Classification of Lymphoid Neoplasms and beyond: Evolving Concepts and Practical Applications." *Blood* 117 (19): 5019–32. doi:10.1182/blood-2011-01-293050.

Canaan, Allon, Izhak Haviv, Alexander E. Urban, Vincent P. Schulz, Steve Hartman, Zhengdong Zhang, Dean Palejev, *et al.* 2009. "EBNA1 Regulates Cellular Gene Expression by Binding Cellular Promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (52): 22421–26. doi:10.1073/pnas.0911676106.

Cayrol, C, and E K Flemington. 1995. "Identification of Cellular Target Genes of the Epstein-Barr Virus Transactivator Zta: Activation of Transforming Growth Factor Beta igh3 (TGF-Beta igh3) and TGF-Beta 1." *Journal of Virology* 69 (7): 4206–12.

Ceccarelli, Derek F. J., and Lori Frappier. 2000. "Functional Analyses of the EBNA1 Origin DNA Binding Protein of Epstein-Barr Virus." *Journal of Virology* 74 (11): 4939–48. doi:10.1128/JVI.74.11.4939-4948.2000.

Cesarman, Ethel. 2014. "Gammaherpesviruses and Lymphoproliferative Disorders." *Annual Review of Pathology* 9: 349–72. doi:10.1146/annurev-pathol-012513-104656.

Chakravorty, Adityarup, and Bill Sugden. 2015. "The AT-Hook DNA Binding Ability of the Epstein Barr Virus EBNA1 Protein Is Necessary for the Maintenance of Viral Genomes in Latently Infected Cells." *Virology* 484 (June): 251–58. doi:10.1016/j.virol.2015.05.018.

Chao, Mei, Hsiao-Ning Wang, Yi Lu, Yu-Sun Chang, and Jau-Song Yu. 2014. "The V-Val Subtype Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Promotes Cell Survival after Serum Withdrawal." *Oncology Reports*, November. doi:10.3892/or.2014.3625.

Chaudhuri, B., H. Xu, I. Todorov, A. Dutta, and J. L. Yates. 2001. “Human DNA Replication Initiation Factors, ORC and MCM, Associate with oriP of Epstein-Barr Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18): 10085–89. doi:10.1073/pnas.181347998.

Chen, Ting, Tara L. Muratore, Christine E. Schaner-Tooley, Jeffrey Shabanowitz, Donald F. Hunt, and Ian G. Macara. 2007. “N-Terminal [alpha]-Methylation of RCC1 Is Necessary for Stable Chromatin Association and Normal Mitosis.” *Nat Cell Biol* 9 (5): 596–603. doi:10.1038/ncb1572.

Chen, T., T. L. Muratore, C. E. Schaner-Tooley, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and I. G. Macara. 2007. “N-Terminal Alpha-Methylation of RCC1 Is Necessary for Stable Chromatin Association and Normal Mitosis.” *Nat Cell Biol* 9 (5): 596–603. doi:10.1038/ncb1572.

Chen, Ya-Lin, Cheng-Der Liu, Chi-Ping Cheng, Bo Zhao, Hao-Jen Hsu, Chih-Long Shen, Shu-Jun Chiu, Elliott Kieff, and Chih-wen Peng. 2014. “Nucleolin Is Important for Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen 1-Mediated Episome Binding, Maintenance, and Transcription.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (1): 243–48. doi:10.1073/pnas.1321800111.

Chen, Ya-Lin, Hsing-Lyn Tsai, and Chih-Wen Peng. 2012. “EGCG Debilitates the Persistence of EBV Latency by Reducing the DNA Binding Potency of Nuclear Antigen 1.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, no. 0. Accessed January 16. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.104.

Chevallier-Greco, A, E Manet, P Chavrier, C Mosnier, J Daillie, and A Sergeant. 1986. “Both Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded Trans-Acting Factors, EB1 and EB2, Are Required to Activate Transcription from an EBV Early Promoter.” *The EMBO Journal* 5 (12): 3243–49.

Chiu, Shih-Hsin, Meng-Chuan Wu, Chung-Chun Wu, Yu-Ching Chen, Su-Fang Lin, John T.-A. Hsu, Chung-Shi Yang, *et al.* 2014. “Epstein-Barr Virus BALF3 Has Nuclease Activity and Mediates Mature Virion Production during the Lytic Cycle.” *Journal of Virology* 88 (9): 4962–75. doi:10.1128/JVI.00063-14.

Clarke, Paul R., and Chuanmao Zhang. 2008. “Spatial and Temporal Coordination of Mitosis by Ran GTPase.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 (6): 464–77. doi:10.1038/nrm2410.

Cohen, Jeffrey I. 2015. “Epstein–barr Virus Vaccines.” *Clinical & Translational Immunology* 4 (1): e32. doi:10.1038/cti.2014.27.

Coppotelli, Giuseppe, Nouman Mughal, and Maria G. Masucci. 2013. “The Gly–Ala Repeat Modulates the Interaction of Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen-1 with Cellular Chromatin.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 431 (4): 706–11. doi:10.1016/j.bbrc.2013.01.054.

Crawford, D. H. 2001. “Biology and Disease Associations of Epstein-Barr Virus.” *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356 (1408): 461–73. doi:10.1098/rstb.2000.0783.

Cushman, Ian, David Stenoien, and Mary Shannon Moore. 2004. “The Dynamic Association of RCC1 with Chromatin Is Modulated by Ran-Dependent Nuclear Transport.” *Molecular Biology of the Cell* 15 (1): 245–55. doi:10.1091/mbc.E03-06-0409.

Delecluse, H. J., and W. Hammerschmidt. 1993. “Status of Marek’s Disease Virus in Established Lymphoma Cell Lines: Herpesvirus Integration Is Common.” *Journal of Virology* 67 (1): 82–92.

Deutsch, Manuel J., Elisabeth Ott, Peer Papior, and Aloys Schepers. 2010. “The Latent Origin of Replication of Epstein-Barr Virus Directs Viral Genomes to Active Regions of the Nucleus” 84 (5): 2533–46. doi:10.1128/JVI.01909-09.

Dharnidharka, Vikas R. 2010. “Epidemiology of PTLD.” In *Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders*, edited by Vikas R. Dharnidharka, Michael Green, and Steven A. Webber, 17–28. Springer Berlin Heidelberg. http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-642-01653-0_3.

Dhar, Suman K., Kenichi Yoshida, Yuichi Machida, Poonam Khaira, Biswendu Chaudhuri, James A. Wohlschlegel, Michael Leffak, John Yates, and Anindya Dutta. 2001. “Replication from oriP of Epstein-Barr Virus Requires Human ORC and Is Inhibited by Geminin.” *Cell* 106 (3): 287–96. doi:16/S0092-8674(01)00458-5.

Dolan, Aidan, Clare Addison, Derek Gatherer, Andrew J. Davison, and Duncan J. McGeoch. 2006. “The Genome of Epstein–Barr Virus Type 2 Strain AG876.” *Virology* 350 (1): 164–70. doi:10.1016/j.virol.2006.01.015.

Domsic, John F., Horng-Shen Chen, Fang Lu, Ronen Marmorstein, and Paul M. Lieberman. 2013. “Molecular Basis for Oligomeric-DNA Binding and Episome Maintenance by KSHV LANA.” *PLoS Pathog* 9 (10): e1003672. doi:10.1371/journal.ppat.1003672.

Dresang, Lindsay R., David T. Vereide, and Bill Sugden. 2009. “Identifying Sites Bound by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) in the Human Genome: Defining a Position-Weighted Matrix To Predict Sites Bound by EBNA1 in Viral Genomes.” *Journal of Virology* 83 (7): 2930–40. doi:10.1128/JVI.01974-08.

Dunn, Walter, Cassie Chou, Hong Li, Rong Hai, David Patterson, Viktor Stolc, Hua Zhu, and Fenyong Liu. 2003. “Functional Profiling of a Human Cytomegalovirus Genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24): 14223–28. doi:10.1073/pnas.2334032100.

Dyer, Pamela N., Raji S. Edayathumangalam, Cindy L. White, Yunhe Bao, Srinivas Chakravarthy, Uma M. Muthurajan, and Karolin Luger. 2004. “Reconstitution of Nucleosome Core Particles from Recombinant Histones and DNA.” *Methods in Enzymology* 375: 23–44.

Endo, Rika, Hideaki Kikuta, Takashi Ebihara, Nobuhisa Ishiguro, and Kunihiko Kobayashi. 2004. “Possible Involvement in Oncogenesis of a Single Base Mutation in an Internal Ribosome Entry Site of Epstein–Barr Nuclear Antigen 1 mRNA.” *Journal of Medical Virology* 72 (4): 630–34. doi:10.1002/jmv.20022.

England, Joseph R., Jiehuan Huang, Matthew J. Jennings, Ravindra D. Makde, and Song Tan. 2010. “RCC1 Uses a Conformationally Diverse Loop Region to Interact with the Nucleosome: A Model for the RCC1–Nucleosome Complex.” *Journal of Molecular Biology* 398 (4): 518–29. doi:10.1016/j.jmb.2010.03.037.

England, J. R., J. Huang, M. J. Jennings, R. D. Makde, and S. Tan. 2010. “RCC1 Uses a Conformationally Diverse Loop Region to Interact with the Nucleosome: A Model for the RCC1-Nucleosome Complex.” *J Mol Biol* 398 (4): 518–29. doi:10.1016/j.jmb.2010.03.037.

Ensser, A., R. Pflanz, and B. Fleckenstein. 1997. “Primary Structure of the Alcelaphine Herpesvirus 1 Genome.” *Journal of Virology* 71 (9): 6517–25.

Epstein, M. A., and B. G. Achong. 1973. “Letter: Epstein-Barr Virus and Infectious Mononucleosis.” *Lancet* 2 (7843): 1437–38.

Epstein, M. A, B. G Achong, and Y. M Barr. 1964. “VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT’S LYMPHOMA.” *The Lancet* 283 (7335): 702–3. doi:10.1016/S0140-6736(64)91524-7.

Fahrbach, Kelly M., Rebecca B. Katzman, and Kathleen Rundell. 2008. “Role of SV40 ST Antigen in the Persistent Infection of Mesothelial Cells.” *Virology* 370 (2): 255–63. doi:10.1016/j.virol.2007.09.008.

Farrell, Katrina, and Ruth F Jarrett. 2011. “The Molecular Pathogenesis of Hodgkin Lymphoma.” *Histopathology* 58 (1): 15–25. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03705.x.

Faulkner, Glenda C., Scott R. Burrows, Rajiv Khanna, Denis J. Moss, A. Graham Bird, and Dorothy H. Crawford. 1999. “X-Linked Agammaglobulinemia Patients Are Not Infected with Epstein-Barr Virus: Implications for the Biology of the Virus.” *Journal of Virology* 73 (2): 1555–64.

Feederle, Regina, Manuela Kost, Matthias Baumann, Annette Janz, Emmanuel Drouet, Wolfgang Hammerschmidt, and Henri-Jacques Delecluse. 2000. “The Epstein–Barr Virus Lytic Program Is Controlled by the Co-Operative Functions of Two Transactivators.” *The EMBO Journal* 19 (12): 3080–89. doi:10.1093/emboj/19.12.3080.

Flamand, Louis, Anthony L. Komaroff, Jesse H. Arbuckle, Peter G. Medveczky, and Dharam V. Ablashi. 2010. “Review, Part 1: Human Herpesvirus-6-Basic Biology, Diagnostic Testing, and Antiviral Efficacy.” *Journal of Medical Virology* 82 (9): 1560–68. doi:10.1002/jmv.21839.

Forbes, Douglass J, Anna Travesa, Matthew S Nord, and Cyril Bernis. 2015. “Nuclear Transport Factors: Global Regulation of Mitosis.” *Current Opinion in Cell Biology*, Cell organelles, 35: 78–90. doi:10.1016/j.ceb.2015.04.012.

Frappier, L., and M. O’Donnell. 1991. “Overproduction, Purification, and Characterization of EBNA1, the Origin Binding Protein of Epstein-Barr Virus.” *The Journal of Biological Chemistry* 266 (12): 7819–26.

Frappier, Lori. 2011. “Viral Disruption of Promyelocytic Leukemia (PML) Nuclear Bodies by Hijacking Host PML Regulators.” *Virulence* 2 (January): 58–62. doi:10.4161/viru.2.1.14610.

———. 2012. “The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein.” *Scientifica* 2012: 1–15. doi:10.6064/2012/438204.

———. 2012. “Role of EBNA1 in NPC Tumourigenesis.” *Seminars in Cancer Biology*, no. 0. Accessed January 3. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.002.

Gahn, T. A., and B. Sugden. 1995. “An EBNA-1-Dependent Enhancer Acts from a Distance of 10 Kilobase Pairs to Increase Expression of the Epstein-Barr Virus LMP Gene.” *Journal of Virology* 69 (4): 2633–36.

Gahn, Toni A., and Carl L. Schildkraut. 1989. “The Epstein-Barr Virus Origin of Plasmid Replication, oriP, Contains Both the Initiation and Termination Sites of DNA Replication.” *Cell* 58 (3): 527–35. doi:10.1016/0092-8674(89)90433-9.

Gatto, Dominique, Katherine Wood, and Robert Brink. 2011. “EBI2 Operates Independently of but in Cooperation with CXCR5 and CCR7 To Direct B Cell Migration and Organization in Follicles and the Germinal Center.” *The Journal of Immunology* 187 (9): 4621–28. doi:10.4049/jimmunol.1101542.

Giulino-Roth, Lisa, and Ethel Cesarman. 2013. “Molecular Biology of Burkitt Lymphoma.” In *Burkitt’s Lymphoma*, edited by Erle Robertson, 211–26. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-4313-1_11.

Goodrum, Felicia, Katie Caviness, and Patricia Zagallo. 2012. “Human Cytomegalovirus Persistence.” *Cellular Microbiology* 14 (5): 644–55. doi:10.1111/j.1462-5822.2012.01774.x.

Goossens, Tina, Ulf Klein, and Ralf Küppers. 1998. “Frequent Occurrence of Deletions and Duplications during Somatic Hypermutation: Implications for Oncogene Translocations and Heavy Chain Disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5): 2463–68.

Gravel, Annie, Daniel Sinnett, and Louis Flamand. 2013. “Frequency of Chromosomally-Integrated Human Herpesvirus 6 in Children with Acute Lymphoblastic Leukemia.” *PLoS ONE* 8 (12): e84322. doi:10.1371/journal.pone.0084322.

Green, M., and M. G. Michaels. 2013. “Epstein–Barr Virus Infection and Posttransplant Lymphoproliferative Disorder.” *American Journal of Transplantation* 13 (s3): 41–54. doi:10.1111/ajt.12004.

Grömminger, Sebastian, Josef Mautner, and Georg W. Bornkamm. 2012. “Burkitt Lymphoma: The Role of Epstein-Barr Virus Revisited.” *British Journal of Haematology* 156 (6): 719–29. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09007.x.

Groux, Hervé, Françoise Cottrez, Claire Montpellier, Brigitte Quatannens, Jean Coll, Dominique Stehelin, and Claude Auriault. 1997. “Isolation and Characterization of Transformed Human T-Cell Lines Infected by Epstein-Barr Virus.” *Blood* 89 (12): 4521–30.

Gruhne, Bettina, Ramakrishna Sompallae, Diego Marescotti, Siamak Akbari Kamranvar, Stefano Gastaldello, and Maria G. Masucci. 2009. “The Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen-1 Promotes Genomic Instability via Induction of Reactive Oxygen Species.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (7): 2313–18. doi:10.1073/pnas.0810619106.

Gruss, Oliver J, Rafael E Carazo-Salas, Christoph A Schatz, Giulia Guarguaglini, Jürgen Kast, Matthias Wilm, Nathalie Le Bot, Isabelle Vernos, Eric Karsenti, and Iain W Mattaj. 2001. “Ran Induces Spindle Assembly by Reversing the Inhibitory Effect of Importin A on TPX2 Activity.” *Cell* 104 (1): 83–93. doi:10.1016/S0092-8674(01)00193-3.

Gutiérrez, M. I., A. Raj, G. Spangler, A. Sharma, A. Hussain, J. G. Judde, S. W. Tsao, *et al.* 1997. “Sequence Variations in EBNA-1 May Dictate Restriction of Tissue Distribution of Epstein-Barr Virus in Normal and Tumour Cells.” *Journal of General Virology* 78 (7): 1663–70.

Haddad, R. S., and L. M. Hutt-Fletcher. 1989. “Depletion of Glycoprotein gp85 from Virosomes Made with Epstein-Barr Virus Proteins Abolishes Their Ability to Fuse with Virus Receptor-Bearing Cells.” *Journal of Virology* 63 (12): 4998–5005.

Hadinoto, Vey, Michael Shapiro, Chia Chi Sun, and David A. Thorley-Lawson. 2009. “The Dynamics of EBV Shedding Implicate a Central Role for Epithelial Cells in Amplifying Viral Output.” *PLoS Pathog* 5 (7): e1000496. doi:10.1371/journal.ppat.1000496.

Hadjebi, O., E. Casas-Terradellas, F. R. Garcia-Gonzalo, and J. L. Rosa. 2008. “The RCC1 Superfamily: From Genes, to Function, to Disease.” *Biochim Biophys Acta* 1783 (8): 1467–79. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.03.015.

Hao, Yi, and Ian G. Macara. 2008. “Regulation of Chromatin Binding by a Conformational Switch in the Tail of the Ran Exchange Factor RCC1.” *The Journal of Cell Biology* 182 (5): 827–36. doi:10.1083/jcb.200803110.

Hao, Y., and I. G. Macara. 2008. “Regulation of Chromatin Binding by a Conformational Switch in the Tail of the Ran Exchange Factor RCC1.” *J Cell Biol* 182 (5): 827–36. doi:10.1083/jcb.200803110.

Harrison, S., K. Fisenne, and J. Hearing. 1994. “Sequence Requirements of the Epstein-Barr Virus Latent Origin of DNA Replication.” *Journal of Virology* 68 (3): 1913–25.

Hatzivassiliou, Eudoxia, and George Mosialos. 2002. “Cellular Signaling Pathways Engaged by the Epstein-Barr Virus Transforming Protein LMP1.” *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 7 (January): d319–29.

Hecht, Jonathan L., and Jon C. Aster. 2000. “Molecular Biology of Burkitt’s Lymphoma.” *Journal of Clinical Oncology* 18 (21): 3707–21.

Henle, Gertrude, Werner Henle, Peter Clifford, Volker Diehl, George W Kafuko, Barnabas G Kirya, Georges Klein, *et al.* 1969. “Antibodies to Epstein-Barr Virus in Burkitt’s Lymphoma and Control Groups.” *J Natl Cancer Inst.*, sec. 43.5.

Hitakomate, Ekarat, Fiona E Hood, Helen S Sanderson, and Paul R Clarke. 2010. “The Methylated N-Terminal Tail of RCC1 Is Required for Stabilisation of Its Interaction with Chromatin by Ran in Live Cells” 11: 43–43. doi:10.1186/1471-2121-11-43.

Hjalgrim, Henrik, Johan Askling, Klaus Rostgaard, Stephen Hamilton-Dutoit, Morten Frisch, Jin-Song Zhang, Mette Madsen, *et al.* 2003. “Characteristics of Hodgkin’s Lymphoma after Infectious Mononucleosis.” *New England Journal of Medicine* 349 (14): 1324–32. doi:10.1056/NEJMoa023141.

Hodin, Theresa L., Tanbir Najrana, and John L. Yates. 2013a. “Efficient Replication of Epstein-Barr Virus-Derived Plasmids Requires Tethering by EBNA1 to Host Chromosomes.” *Journal of Virology* 87 (23): 13020–28. doi:10.1128/JVI.01606-13.

Hong, Mei, Yoshihiro Murai, Tomohiko Kutsuna, Hiroyuki Takahashi, Kazuhiro Nomoto, Chun-Mei Cheng, Shin Ishizawa, *et al.* 2006. “Suppression of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) by RNA Interference Inhibits Proliferation of EBV-Positive Burkitt’s Lymphoma Cells.” *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 132 (1): 1–8. doi:10.1007/s00432-005-0036-x.

Hood, Fiona E., and Paul R. Clarke. 2007. “RCC1 Isoforms Differ in Their Affinity for Chromatin, Molecular Interactions and Regulation by Phosphorylation.” *Journal of Cell Science* 120 (19): 3436–45. doi:10.1242/jcs.009092.

Hoshino, Yo, Tsuneo Morishima, Hiroshi Kimura, Kazuo Nishikawa, Tatsuya Tsurumi, and Kiyotaka Kuzushima. 1999. “Antigen-Driven Expansion and Contraction of CD8+-Activated T Cells in Primary EBV Infection.” *The Journal of Immunology* 163 (10): 5735–40.

Hui, Edwin P., Graham S. Taylor, Hui Jia, Brigette B. Y. Ma, Stephen L. Chan, Rosalie Ho, Wai-Lap Wong, *et al.* 2013. “Phase I Trial of Recombinant Modified Vaccinia Ankara Encoding Epstein–Barr Viral Tumor Antigens in Nasopharyngeal Carcinoma Patients.” *Cancer Research* 73 (6): 1676–88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2448.

Humme, Sibille, Gilbert Reisbach, Regina Feederle, Henri-Jacques Delecluse, Kristine Bousset, Wolfgang Hammerschmidt, and Aloys Schepers. 2003. “The EBV Nuclear Antigen 1 (EBNA1) Enhances B Cell Immortalization Several Thousandfold.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (19): 10989–94. doi:10.1073/pnas.1832776100.

Hussain, Mushtaq, Derek Gatherer, and Joanna B. Wilson. 2014. “Modelling the Structure of Full-Length Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen 1.” *Virus Genes*, July, 1–15. doi:10.1007/s11262-014-1101-9.

Hutchins, James R.A, William J Moore, Fiona E Hood, Jamie S.J Wilson, Paul D Andrews, Jason R Swedlow, and Paul R Clarke. 2004a. “Phosphorylation Regulates the Dynamic Interaction of RCC1 with Chromosomes during Mitosis.” *Current Biology* 14 (12): 1099–1104. doi:16/j.cub.2004.05.021.

Hutchins, James R. A., William J. Moore, Fiona E. Hood, Jamie S. J. Wilson, Paul D. Andrews, Jason R. Swedlow, and Paul R. Clarke. 2004b. “Phosphorylation Regulates the Dynamic Interaction of RCC1 with Chromosomes during Mitosis.” *Current Biology: CB* 14 (12): 1099–1104. doi:10.1016/j.cub.2004.05.021.

Isaksson, Asa, Malin Berggren, Kerstin Ekeland-Sjöberg, Tore Samuelsson, and Anne Ricksten. 2007. “Cell Specific Internal Translation Efficiency of Epstein-Barr Virus Present in Solid Organ Transplant Patients.” *Journal of Medical Virology* 79 (5): 573–81. doi:10.1002/jmv.20854.

Isaksson, Åsa, Malin Berggren, and Anne Ricksten. 2003. “Epstein–Barr Virus U Leader Exon Contains an Internal Ribosome Entry Site.” *Oncogene* 22 (4): 572–81. doi:10.1038/sj.onc.1206149.

Ito, Sayuri, Masato Ikeda, Noriko Kato, Akiko Matsumoto, Yuko Ishikawa, Satomi Kumakubo, and Kazuo Yanagi. 2000. “Epstein–Barr Virus Nuclear Antigen-1 Binds to Nuclear Transporter Karyopherin α1/NPI-1 in Addition to Karyopherin α2/Rch1.” *Virology* 266 (1): 110–19. doi:10.1006/viro.1999.0054.

Iwakiri, Dai, and Kenzo Takada. 2010. “Role of EBERs in the Pathogenesis of EBV Infection.” In , Volume 107:119–36. Academic Press. http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065230X10070041.

Jiang, R., R. S. Scott, and L. M. Hutt-Fletcher. 2006. “Epstein-Barr Virus Shed in Saliva Is High in B-Cell-Tropic Glycoprotein gp42.” *Journal of Virology* 80 (14): 7281–83. doi:10.1128/JVI.00497-06.

Jiménez-Ramírez, Carmilia, Andrew J. Brooks, Linus Plym Forshell, Konstantin Yakimchuk, Bo Zhao, Tacha Zi Fulgham, and Clare E. Sample. 2006. “Epstein-Barr Virus EBNA-3C Is Targeted to and Regulates Expression from the Bidirectional LMP-1/2B Promoter.” *Journal of Virology* 80 (22): 11200–208. doi:10.1128/JVI.00897-06.

Jochum, Simon, Andreas Moosmann, Stephan Lang, Wolfgang Hammerschmidt, and Reinhard Zeidler. 2012. “The EBV Immunoevasins vIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination.” *PLoS Pathog* 8 (5): e1002704. doi:10.1371/journal.ppat.1002704.

Johannsen, Eric, Micah Luftig, Michael R. Chase, Steve Weicksel, Ellen Cahir-McFarland, Diego Illanes, David Sarracino, and Elliott Kieff. 2004. “Proteins of Purified Epstein-Barr Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (46): 16286–91. doi:10.1073/pnas.0407320101.

Johnson, David C., and Joel D. Baines. 2011. “Herpesviruses Remodel Host Membranes for Virus Egress.” *Nature Reviews Microbiology* 9 (5): 382–94. doi:10.1038/nrmicro2559.

Jones, C. H., S. D. Hayward, and D. R. Rawlins. 1989. “Interaction of the Lymphocyte-Derived Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen EBNA-1 with Its DNA-Binding Sites.” *Journal of Virology* 63 (1): 101–10.

Jourdan, Nathalie, Aude Jobart-Malfait, Gabriel Dos Reis, Frédérique Quignon, Tristan Piolot, Christophe Klein, Marc Tramier, Maïté Coppey-Moisan, and Vincent Marechal. 2012. “Live-Cell Imaging Reveals Multiple Interactions between Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 and Cellular Chromatin during Interphase and Mitosis.” *Journal of Virology* 86 (9): 5314–29. doi:10.1128/JVI.06303-11.

Jourdan, Nathalie, Aude Jobart-Malfait, Gabriel Dos Reis, Frédérique Quignon, Tristan Piolot, Christophe Klein, Marc Tramier, Maïté Coppey-Moisan, and Vincent Marechal. 2012. “Live-Cell Imaging Reveals Multiple Interactions between Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 and Cellular Chromatin during Interphase and Mitosis.” *Journal of Virology* 86 (9): 5314–29. doi:10.1128/JVI.06303-11.

Kalashnikova, Anna A., Mary E. Porter-Goff, Uma M. Muthurajan, Karolin Luger, and Jeffrey C. Hansen. 2013. “The Role of the Nucleosome Acidic Patch in Modulating Higher Order Chromatin Structure.” *Journal of The Royal Society Interface* 10 (82). doi:10.1098/rsif.2012.1022.

Kalla, Markus, Anne Schmeinck, Martin Bergbauer, Dagmar Pich, and Wolfgang Hammerschmidt. 2010. “AP-1 Homolog BZLF1 of Epstein–Barr Virus Has Two Essential Functions Dependent on the Epigenetic State of the Viral Genome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (2): 850–55. doi:10.1073/pnas.0911948107.

Kanda, Teru, Naoki Horikoshi, Takayuki Murata, Daisuke Kawashima, Atsuko Sugimoto, Yohei Narita, Hitoshi Kurumizaka, and Tatsuya Tsurumi. 2013. “Interaction between Basic Residues of Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein and Cellular Chromatin Mediates Viral Plasmid Maintenance.” *Journal of Biological Chemistry*, July. doi:10.1074/jbc.M113.491167.

Kanda, Teru, Masato Kamiya, Seiji Maruo, Dai Iwakiri, and Kenzo Takada. 2007. “Symmetrical Localization of Extrachromosomally Replicating Viral Genomes on Sister Chromatids.” *Journal of Cell Science* 120 (9): 1529–39. doi:10.1242/jcs.03434.

Kanda, T., M. Otter, and G. M. Wahl. 2001. “Coupling of Mitotic Chromosome Tethering and Replication Competence in Epstein-Barr Virus-Based Plasmids.” *Molecular and Cellular Biology* 21 (10): 3576–88. doi:10.1128/MCB.21.10.3576-3588.2001.

Kaneko, T., J. Fukuda, T. Yoshihara, H. Zheng, S. Mori, H. Mizoguchi, and K. Oshimi. 1995. "Nasal Natural Killer (NK) Cell Lymphoma: Report of a Case with Activated NK Cells Containing Epstein-Barr Virus and Expressing CD21 Antigen, and Comparative Studies of Their Phenotype and Cytotoxicity with Normal NK Cells." *British Journal of Haematology* 91 (2): 355–61.

Kang, Myung-Soo, Vishal Soni, Roderick Bronson, and Elliott Kieff. 2008. "Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Does Not Cause Lymphoma in C57BL/6J Mice." *Journal of Virology* 82 (8): 4180–83. doi:10.1128/JVI.02596-07.

Kapoor, P. 2001. "Reconstitution of Epstein-Barr Virus-Based Plasmid Partitioning in Budding Yeast." *The EMBO Journal* 20 (1): 222–30. doi:10.1093/emboj/20.1.222.

Kapoor, P., and L. Frappier. 2003. "EBNA1 Partitions Epstein-Barr Virus Plasmids in Yeast Cells by Attaching to Human EBNA1-Binding Protein 2 on Mitotic Chromosomes." *J Virol* 77 (12): 6946–56.

Kapoor, Priya, and Lori Frappier. 2003. "EBNA1 Partitions Epstein-Barr Virus Plasmids in Yeast Cells by Attaching to Human EBNA1-Binding Protein 2 on Mitotic Chromosomes." *Journal of Virology* 77 (12): 6946–56. doi:10.1128/JVI.77.12.6946-6956.2003.

Kapoor, Priya, Brigitte D. Lavoie, and Lori Frappier. 2005. "EBP2 Plays a Key Role in Epstein-Barr Virus Mitotic Segregation and Is Regulated by Aurora Family Kinases." *Mol. Cell. Biol.* 25 (12): 4934–45. doi: 10.1128/MCB.25.12.4934-4945.2005 .

Kapoor, P., K. Shire, and L. Frappier. 2001. "Reconstitution of Epstein-Barr Virus-Based Plasmid Partitioning in Budding Yeast." *EMBO J* 20 (1-2): 222–30. doi:10.1093/emboj/20.1.222.

Kaschka-Dierich, C., L. Falk, G. Bjursell, A. Adams, and T. Lindahl. 1977. "Human Lymphoblastoid Cell Lines Derived from Individuals without Lymphoproliferative Disease Contain the Same Latent Forms of Epstein-Barr Virus DNA as Those Found in Tumor Cells." *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 20 (2): 173–80.

Kaufer, Benedikt B, and Louis Flamand. 2014. "Chromosomally Integrated HHV-6: Impact on Virus, Cell and Organismal Biology." *Current Opinion in Virology*, Virus replication animals and plants / Roseoloviruses, 9: 111–18. doi:10.1016/j.coviro.2014.09.010.

Kaufer, Benedikt B., Keith W. Jarosinski, and Nikolaus Osterrieder. 2011. "Herpesvirus Telomeric Repeats Facilitate Genomic Integration into Host Telomeres and Mobilization of Viral DNA during Reactivation." *The Journal of Experimental Medicine* 208 (3): 605–15. doi:10.1084/jem.20101402.

Kaul, Rajeev, Masanao Murakami, Tathagata Choudhuri, and Erle S. Robertson. 2007. "Epstein-Barr Virus Latent Nuclear Antigens Can Induce Metastasis in a Nude Mouse Model." *Journal of Virology* 81 (19): 10352–61. doi:10.1128/JVI.00886-07.

Kennedy, Gregory, Jun Komano, and Bill Sugden. 2003. "Epstein-Barr Virus Provides a Survival Factor to Burkitt's Lymphomas." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24): 14269–74. doi:10.1073/pnas.2336099100.

Kenney, Shannon. 2006. “Theodore E. Woodward Award: Development of Novel, EBV-Targeted Therapies for EBV-Positive Tumors.” *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 117: 55–74.

Khan, Gulfaraz, and Muhammad J. Hashim. 2014. “Global Burden of Deaths from Epstein-Barr Virus Attributable Malignancies 1990-2010.” *Infectious Agents and Cancer* 9 (1): 38. doi:10.1186/1750-9378-9-38.

Kieff, E., and A. B. Rickinson. 2007. “Epstein Barr Virus and Its Replication.” In *Fields Virology*, edited by D. M. Knipe, fifth:2063–2654. Wolters Kluwer/ Lippincott Williams &Wilkins.

Kirchmaier, A. L., and B. Sugden. 1995. “Plasmid Maintenance of Derivatives of oriP of Epstein-Barr Virus.” *Journal of Virology* 69 (2): 1280–83.

Kirchmaier, Ann L., and Bill Sugden. 1998. “Rep*: A Viral Element That Can Partially Replace the Origin of Plasmid DNA Synthesis of Epstein-Barr Virus.” *Journal of Virology* 72 (6): 4657–66.

Kis, Loránd L., Daniel Salamon, Emma K. Persson, Noémi Nagy, Ferenc A. Scheeren, Hergen Spits, George Klein, and Eva Klein. 2010. “IL-21 Imposes a Type II EBV Gene Expression on Type III and Type I B Cells by the Repression of C- and Activation of LMP-1-Promoter” 107 (2): 872–77. doi:10.1073/pnas.0912920107.

Kitagawa, Norihiko, Miyuki Goto, Kimikazu Kurozumi, Seiji Maruo, Masashi Fukayama, Tomoki Naoe, Masaki Yasukawa, *et al.* 2000. “Epstein–Barr Virus-Encoded poly(A)–RNA Supports Burkitt’s Lymphoma Growth through Interleukin-10 Induction.” *The EMBO Journal* 19 (24): 6742–50. doi:10.1093/emboj/19.24.6742.

Kitamura, Ryo, Toshihiro Sekimoto, Sayuri Ito, Shizuko Harada, Hideo Yamagata, Hisao Masai, Yoshihiro Yoneda, and Kazuo Yanagi. 2006. “Nuclear Import of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Mediated by NPI-1 (Importin α5) Is Up- and Down-Regulated by Phosphorylation of the Nuclear Localization Signal for Which Lys379 and Arg380 Are Essential.” *Journal of Virology* 80 (4): 1979–91. doi:10.1128/JVI.80.4.1979-1991.2006.

Klein, G. 1983. “Specific Chromosomal Translocations and the Genesis of B-Cell-Derived Tumors in Mice and Men.” *Cell* 32 (2): 311–15.

Kohn, Kurt W., Mirit I. Aladjem, John N. Weinstein, and Yves Pommier. 2008. “Chromatin Challenges during DNA Replication: A Systems Representation.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (1): 1–7. doi:10.1091/mbc.E07-06-0528.

Krithivas, Anita, Masahiro Fujimuro, Magdalena Weidner, David B. Young, and S. Diane Hayward. 2002. “Protein Interactions Targeting the Latency-Associated Nuclear Antigen of Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus to Cell Chromosomes.” *Journal of Virology* 76 (22): 11596–604.

Laichalk, Lauri L., and David A. Thorley-Lawson. 2005. “Terminal Differentiation into Plasma Cells Initiates the Replicative Cycle of Epstein-Barr Virus In Vivo.” *Journal of Virology* 79 (2): 1296–1307. doi:10.1128/JVI.79.2.1296-1307.2005.

Laine, Alexandra, and Lori Frappier. 1995. “Identification of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Protein Domains That Direct Interactions at a Distance between DNA-Bound Proteins.” *Journal of Biological Chemistry* 270 (52): 30914–18. doi:10.1074/jbc.270.52.30914.

Latour, Sylvain, and Claire Aguilar. 2015. “XIAP Deficiency Syndrome in Humans.” *Seminars in Cell & Developmental Biology*. Accessed April 14. doi:10.1016/j.semcdb.2015.01.015.

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.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (23): 12616–21. doi:10.1073/pnas.94.23.12616.

Lieberman, Paul M. 2013. “Keeping It Quiet: Chromatin Control of Gammaherpesvirus Latency.” *Nature Reviews Microbiology* advance online publication (November). doi:10.1038/nrmicro3135.

Li, Hoi Yeung, Denis Wirtz, and Yixian Zheng. 2003. “A Mechanism of Coupling RCC1 Mobility to RanGTP Production on the Chromatin in Vivo.” *The Journal of Cell Biology* 160 (5): 635–44. doi:10.1083/jcb.200211004.

Li, Hoi-Yeung, and Yixian Zheng. 2004. “Phosphorylation of RCC1 in Mitosis Is Essential for Producing a High RanGTP Concentration on Chromosomes and for Spindle Assembly in Mammalian Cells.” *Genes & Development* 18 (5): 512–27. doi:10.1101/gad.1177304.

Li, Hoi Y., Win Pin Ng, Wong Chi Hang, Pablo A. Iglesias, and Yixian Zheng. 2007. “Coordination of Chromosome Alignment and Mitotic Progression Chromosome-Based Ran Signal.” *Cell Cycle* 6 (15): 1886–95. doi:10.4161/cc.6.15.4487.

Li, H. Y., D. Wirtz, and Y. Zheng. 2003. “A Mechanism of Coupling RCC1 Mobility to RanGTP Production on the Chromatin in Vivo.” *J Cell Biol* 160 (5): 635–44. doi:10.1083/jcb.200211004.

Li, H. Y., and Y. Zheng. 2004. “Phosphorylation of RCC1 in Mitosis Is Essential for Producing a High RanGTP Concentration on Chromosomes and for Spindle Assembly in Mammalian Cells.” *Genes Dev* 18 (5): 512–27. doi:10.1101/gad.1177304.

Lin, Ammy, Shan Wang, Tin Nguyen, Kathy Shire, and Lori Frappier. 2008. “The EBNA1 Protein of Epstein-Barr Virus Functionally Interacts with Brd4.” *Journal of Virology* 82 (24): 12009–19. doi:10.1128/JVI.01680-08.

Little, R. D., and C. L. Schildkraut. 1995. “Initiation of Latent DNA Replication in the Epstein-Barr Virus Genome Can Occur at Sites Other than the Genetically Defined Origin.” *Molecular and Cellular Biology* 15 (5): 2893–2903.

Liu, Jah-Yao, Tzu-Chao Chuang, Tzong-Der Way, Tzung-Chieh Tsai, Chih-Lin Hu, Guang-Yaw Liu, Shan-Shue Wang, Jing-Gung Chung, and Ming-Ching Kao. 2009. “The N-Terminal Domain of EBNA1 Acts as a Suppressor of the HER2/neu Oncogene.” *Cancer Letters* 273 (2): 273–80. doi:10.1016/j.canlet.2008.08.013.

Lo, Y. M. Dennis. 2001. “Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus DNA in Plasma and Serum.” *Annals of the New York Academy of Sciences* 945 (1): 68–72. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb03865.x.

Lucas, K. G., T. N. Small, G. Heller, B. Dupont, and R. J. O’Reilly. 1996. “The Development of Cellular Immunity to Epstein-Barr Virus after Allogeneic Bone Marrow Transplantation.” *Blood* 87 (6): 2594–2603.

Lu, Jie, Masanao Murakami, Subhash C. Verma, Qiliang Cai, Sabyasachi Haldar, Rajeev Kaul, Mariusz A. Wasik, Jaap Middeldorp, and Erle S. Robertson. 2010. “Epstein-Barr

Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1) Confers Resistance to Apoptosis in EBV-Positive B-Lymphoma Cells through up-Regulation of Survivin." *Virology* In Press, Corrected Proof. Accessed December 15. doi:10.1016/j.virol.2010.10.029.

Lu, Quanlong, Zhigang Lu, Qinying Liu, Li Guo, He Ren, Jingyan Fu, Qing Jiang, Paul R. Clarke, and Chuanmao Zhang. 2012. "Chromatin-Bound NLS Proteins Recruit Membrane Vesicles and Nucleoporins for Nuclear Envelope Assembly via Importin-A/β." *Cell Research* 22 (11): 1562–75. doi:10.1038/cr.2012.113.

Mackey, D., T. Middleton, and B. Sugden. 1995. "Multiple Regions within EBNA1 Can Link DNAs." *J. Virol.* 69 (10): 6199–6208.

Mackey, D., and B. Sugden. 1999. "The Linking Regions of EBNA1 Are Essential for Its Support of Replication and Transcription." *Molecular and Cellular Biology* 19 (5): 3349–59.

Makde, Ravindra D., Joseph R. England, Hemant P. Yennawar, and Song Tan. 2010. "Structure of RCC1 Chromatin Factor Bound to the Nucleosome Core Particle." *Nature* 467 (7315): 562–66. doi:10.1038/nature09321.

Makde, R. D., J. R. England, H. P. Yennawar, and S. Tan. 2011. "Structure of RCC1 Chromatin Factor Bound to the Nucleosome Core Particle." *Nature* 467 (7315): 562–66. doi:10.1038/nature09321.

Manet, E., A. Sergeant, and H. Gruffat. 2003. "Cycle Productif Du Virus d'Epstein-Barr : Rôle de La Protéine Virale EB1 Dans L'activation Du Cycle Productif et Interactions Protéine EB1-cellules Hôte." *Virologie* 7 (2): 111–23.

Mansouri, Sheila, Qun Pan, Benjamin J. Blencowe, Julie M. Claycomb, and Lori Frappier. 2014. "Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein Regulates Viral Latency through Effects on Let-7 MicroRNA and Dicer." *Journal of Virology* 88 (19): 11166–77. doi:10.1128/JVI.01785-14.

Marechal, V., A. Dehee, R. Chikhi-Brachet, T. Piolot, M. Coppey-Moisan, and J. C. Nicolas. 1999. "Mapping EBNA-1 Domains Involved in Binding to Metaphase Chromosomes." *J Virol* 73 (5): 4385–92.

Marechal, Vincent, Axelle Dehee, Roxane Chikhi-Brachet, Tristan Piolot, Maité Coppey-Moisan, and Jean-Claude Nicolas. 1999. "Mapping EBNA-1 Domains Involved in Binding to Metaphase Chromosomes." *Journal of Virology* 73 (5): 4385–92.

Masy, Eric, Eric Adriaenssens, Claire Montpellier, Pascale Crépieux, Alexandra Mougel, Brigitte Quatannens, Gautier Goormachtigh, *et al.* 2002. "Human Monocytic Cell Lines Transformed In Vitro by Epstein-Barr Virus Display a Type II Latency and LMP-1-Dependent Proliferation." *Journal of Virology* 76 (13): 6460–72. doi:10.1128/JVI.76.13.6460-6472.2002.

Matsumoto, Yusuke, Yohei Hayashi, Hiroko Omori, Tomoyuki Honda, Takuji Daito, Masayuki Horie, Kazuyoshi Ikuta, *et al.* 2012. "Bornavirus Closely Associates and Segregates with Host Chromosomes to Ensure Persistent Intranuclear Infection." *Cell Host & Microbe* 11 (5): 492–503. doi:10.1016/j.chom.2012.04.009.

Mauser, Amy, Elizabeth Holley-Guthrie, Adam Zanation, Wendall Yarborough, William Kaufmann, Aloysius Klingelhutz, William T. Seaman, and Shannon Kenney. 2002. "The Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BZLF1 Induces Expression of E2F-1 and Other Proteins Involved in Cell Cycle Progression in Primary Keratinocytes and

Gastric Carcinoma Cells." *Journal of Virology* 76 (24): 12543–52. doi:10.1128/JVI.76.24.12543-12552.2002.

McGeoch, Duncan J., and Andrew J. Davison. 1999. "The Molecular Evolutionary History of the Herpesviruses." *London: Academic Press*, Origin and Evolution of Viruses, , 441–65.

McGeoch, Duncan J., and Derek Gatherer. 2005. "Integrating Reptilian Herpesviruses into the Family Herpesviridae." *Journal of Virology* 79 (2): 725–31. doi:10.1128/JVI.79.2.725-731.2005.

Middleton, T., and B. Sugden. 1994. "Retention of Plasmid DNA in Mammalian Cells Is Enhanced by Binding of the Epstein-Barr Virus Replication Protein EBNA1." *Journal of Virology* 68 (6): 4067–71.

Moore, William J, Chuanmao Zhang, and Paul R Clarke. 2002. "Targeting of RCC1 to Chromosomes Is Required for Proper Mitotic Spindle Assembly in Human Cells." *Current Biology* 12 (16): 1442–47. doi:10.1016/S0960-9822(02)01076-X.

Moormann, Ann M., Cynthia J. Snider, and Kiprotich Chelimo. 2011. "The Company Malaria Keeps: How Co-Infection with Epstein-Barr Virus Leads to Endemic Burkitt Lymphoma." *Current Opinion in Infectious Diseases* 24 (5): 435–41. doi:10.1097/QCO.0b013e328349ac4f.

Moriyama, Kenji, Naoko Yoshizawa-Sugata, Chikashi Obuse, Toshiki Tsurimoto, and Hisao Masai. 2012. "Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1)-Dependent Recruitment of Origin Recognition Complex (Orc) on oriP of Epstein-Barr Virus with Purified Proteins STIMULATION BY Cdc6 THROUGH ITS DIRECT INTERACTION WITH EBNA1." *Journal of Biological Chemistry* 287 (28): 23977–94. doi:10.1074/jbc.M112.368456.

Morrison, Thomas E, Amy Mauser, Athena Wong, Jenny P. -Y Ting, and Shannon C Kenney. 2001. "Inhibition of IFN-Γ Signaling by an Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein." *Immunity* 15 (5): 787–99. doi:10.1016/S1074-7613(01)00226-6.

Morscio, J., D. Dierickx, and T. Tousseyn. 2013. "Molecular Pathogenesis of B-Cell Posttransplant Lymphoproliferative Disorder: What Do We Know So Far?" *Clinical and Developmental Immunology* 2013. doi:10.1155/2013/150835.

Mullis, K. B., and F. A. Faloona. 1987. "Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction." *Methods in Enzymology* 155: 335–50.

Münz, Christian. 2004. "Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 from Immunologically Invisible to a Promising T Cell Target." *The Journal of Experimental Medicine* 199 (10): 1301–4. doi:10.1084/jem.20040730.

Murukesan, Vidhya, and Dr Sandeep Mukherjee. 2012. "Managing Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders in Solid-Organ Transplant Recipients." *Drugs* 72 (12): 1631–43. doi:10.2165/11635690-000000000-00000.

Nanbo, Asuka, Arthur Sugden, and Bill Sugden. 2007. "The Coupling of Synthesis and Partitioning of EBV's Plasmid Replicon Is Revealed in Live Cells." *The EMBO Journal* 26 (19): 4252–62. doi:10.1038/sj.emboj.7601853.

Nanbo, Asuka, and Kenzo Takada. 2002. “The Role of Epstein–Barr Virus-encoded Small RNAs (EBERs) in Oncogenesis.” *Reviews in Medical Virology* 12 (5): 321–26. doi:10.1002/rmv.363.

Nasimuzzaman, Md, Masayuki Kuroda, Sumitaka Dohno, Takenobu Yamamoto, Keiji Iwatsuki, Shigenobu Matsuzaki, Rashel Mohammad, *et al.* 2005. “Eradication of Epstein–barr Virus Episome and Associated Inhibition of Infected Tumor Cell Growth by Adenovirus Vector-Mediated Transduction of Dominant-Negative EBNA1.” *Molecular Therapy* 11 (4): 578–90. doi:10.1016/j.ymthe.2004.12.017.

Nayyar, Vipra Kapur, Kathy Shire, and Lori Frappier. 2009. “Mitotic Chromosome Interactions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) and Human EBNA1-Binding Protein 2 (EBP2).” *Journal of Cell Science* 122 (Pt 23): 4341–50. doi:10.1242/jcs.060913.

Nayyar, V. K., K. Shire, and L. Frappier. 2009. “Mitotic Chromosome Interactions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) and Human EBNA1-Binding Protein 2 (EBP2).” *J Cell Sci* 122 (Pt 23): 4341–50. doi:10.1242/jcs.060913.

Nemergut, M. E., C. A. Mizzen, T. Stukenberg, C. D. Allis, and I. G. Macara. 2001. “Chromatin Docking and Exchange Activity Enhancement of RCC1 by Histones H2A and H2B.” *Science (New York, N.Y.)* 292 (5521): 1540–43. doi:10.1126/science.292.5521.1540.

Nemergut, Michael E., Craig A. Mizzen, Todd Stukenberg, C. David Allis, and Ian G. Macara. 2001. “Chromatin Docking and Exchange Activity Enhancement of RCC1 by Histones H2A and H2B.” *Science* 292 (5521): 1540–43. doi:10.1126/science.292.5521.1540.

Nishikawa, Jun, Hironori Yoshiyama, Hisashi Iizasa, Yuichi Kanehiro, Munetaka Nakamura, Junichi Nishimura, Mari Saito, *et al.* 2014. “Epstein-Barr Virus in Gastric Carcinoma.” *Cancers* 6 (4): 2259–74. doi:10.3390/cancers6042259.

Norseen, Julie, F. Brad Johnson, and Paul M. Lieberman. 2009. “Role for G-Quadruplex RNA Binding by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in DNA Replication and Metaphase Chromosome Attachment.” *J. Virol.* 83 (20): 10336–46. doi: 10.1128/JVI.00747-09 .

Norseen, Julie, Andreas Thomae, Venkatesh Sridharan, Ashok Aiyar, Aloys Schepers, and Paul M Lieberman. 2008. “RNA-Dependent Recruitment of the Origin Recognition Complex.” *The EMBO Journal* 27 (22): 3024–35. doi:10.1038/emboj.2008.221.

Ogembo, Javier G., Lakshmi Kannan, Ionita Ghiran, Anne Nicholson-Weller, Robert W. Finberg, George C. Tsokos, and Joyce D. Fingeroth. 2013. “Human Complement Receptor Type 1/CD35 Is an Epstein-Barr Virus Receptor.” *Cell Reports* 3 (2): 371–85. doi:10.1016/j.celrep.2013.01.023.

Ohsaki, Eriko, and Keiji Ueda. 2012. “Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Replication, Partitioning, and Maintenance in Latency.” *Frontiers in Microbiology* 3 (January). doi:10.3389/fmicb.2012.00007.

Ohshima, Koichi, Junji Suzumiya, Motonobu Kanda, Akiko Kato, and Masahiro Kikuchi. 1998. “Integrated and Episomal Forms of Epstein–Barr Virus (EBV) in EBV Associated Disease.” *Cancer Letters* 122 (1–2): 43–50. doi:10.1016/S0304-3835(97)00368-6.

Ohtani, Naoko, Paul Brennan, Stefan Gaubatz, Elaine Sanij, Paul Hertzog, Ernst Wolvetang, Jacques Ghysdael, Martin Rowe, and Eiji Hara. 2003. "Epstein-Barr Virus LMP1 Blocks p16INK4a–RB Pathway by Promoting Nuclear Export of E2F4/5." *The Journal of Cell Biology* 162 (2): 173–83. doi:10.1083/jcb.200302085.

Pajic, Alexander, Martin S. Staege, Diana Dudziak, Marino Schuhmacher, Dimitri Spitkovsky, Günther Eissner, Markus Brielmeier, Axel Polack, and Georg W. Bornkamm. 2001. "Antagonistic Effects of c-Myc and Epstein-Barr Virus Latent Genes on the Phenotype of Human B Cells." *International Journal of Cancer* 93 (6): 810–16. doi:10.1002/ijc.1404.

Panagopoulos, Dimitris, Panayiotis Victoratos, Maria Alexiou, George Kollias, and George Mosialos. 2004. "Comparative Analysis of Signal Transduction by CD40 and the Epstein-Barr Virus Oncoprotein LMP1 In Vivo." *Journal of Virology* 78 (23): 13253–61. doi:10.1128/JVI.78.23.13253-13261.2004.

Park, Sanghui, and Young H. Ko. 2014. "Epstein–Barr Virus-Associated T/natural Killer-Cell Lymphoproliferative Disorders." *The Journal of Dermatology* 41 (1): 29–39. doi:10.1111/1346-8138.12322.

Pereira, João Pedro, Lisa M. Kelly, and Jason G. Cyster. 2010. "Finding the Right Niche: B-Cell Migration in the Early Phases of T-Dependent Antibody Responses." *International Immunology* 22 (6): 413–19. doi:10.1093/intimm/dxq047.

Perrine, Susan P., Olivier Hermine, Trudy Small, Felipe Suarez, Richard O'Reilly, Farid Boulad, Joyce Fingeroth, *et al.* 2007. "A Phase 1/2 Trial of Arginine Butyrate and Ganciclovir in Patients with Epstein-Barr Virus–associated Lymphoid Malignancies." *Blood* 109 (6): 2571–78. doi:10.1182/blood-2006-01-024703.

Polack, A, K Hörtnagel, A Pajic, B Christoph, B Baier, M Falk, J Mautner, C Geltinger, G W Bornkamm, and B Kempkes. 1996. "C-Myc Activation Renders Proliferation of Epstein-Barr Virus (EBV)-Transformed Cells Independent of EBV Nuclear Antigen 2 and Latent Membrane Protein 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (19): 10411–16.

Purtilo, D. T., C. K. Cassel, J. P. Yang, and R. Harper. 1975. "X-Linked Recessive Progressive Combined Variable Immunodeficiency (Duncan's Disease)." *Lancet* 1 (7913): 935–40.

Qiu, Jin, Pamela Smith, Leah Leahy, and David A. Thorley-Lawson. 2015. "The Epstein-Barr Virus Encoded BART miRNAs Potentiate Tumor Growth In Vivo." *PLoS Pathog* 11 (1): e1004561. doi:10.1371/journal.ppat.1004561.

Rawlins, Dan R., Gregory Milman, S. Diane Hayward, and Gary S. Hayward. 1985. "Sequence-Specific DNA Binding of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA-1) to Clustered Sites in the Plasmid Maintenance Region." *Cell* 42 (3): 859–68. doi:10.1016/0092-8674(85)90282-X.

Rawlins, D. R., G. Milman, S. D. Hayward, and G. S. Hayward. 1985. "Sequence-Specific DNA Binding of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen (EBNA-1) to Clustered Sites in the Plasmid Maintenance Region." *Cell* 42 (3): 859–68.

Redondo-Muñoz, Javier, Vicente Pérez-García, María J. Rodríguez, José M. Valpuesta, and Ana C. Carrera. 2015. "Phosphoinositide 3-Kinase Beta Protects Nuclear Envelope Integrity by Controlling RCC1 Localization and Ran Activity." *Molecular and Cellular Biology* 35 (1): 249–63. doi:10.1128/MCB.01184-14.

Reisman, D., and B. Sugden. 1986. “Trans Activation of an Epstein-Barr Viral Transcriptional Enhancer by the Epstein-Barr Viral Nuclear Antigen 1.” *Molecular and Cellular Biology* 6 (11): 3838–46. doi:10.1128/MCB.6.11.3838.

Reisman, D., J. Yates, and B. Sugden. 1985. “A Putative Origin of Replication of Plasmids Derived from Epstein-Barr Virus Is Composed of Two Cis-Acting Components.” *Molecular and Cellular Biology* 5 (8): 1822–32.

Renault, L., J. Kuhlmann, A. Henkel, and A. Wittinghofer. 2001. “Structural Basis for Guanine Nucleotide Exchange on Ran by the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1).” *Cell* 105 (2): 245–55.

Renault, L., N. Nassar, I. Vetter, J. Becker, C. Klebe, M. Roth, and A. Wittinghofer. 1998. “The 1.7 A Crystal Structure of the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1) Reveals a Seven-Bladed Propeller.” *Nature* 392 (6671): 97–101. doi:10.1038/32204.

Renault, Louis, Jürgen Kuhlmann, Andreas Henkel, and Alfred Wittinghofer. 2001. “Structural Basis for Guanine Nucleotide Exchange on Ran by the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1).” *Cell* 105 (2): 245–55. doi:10.1016/S0092-8674(01)00315-4.

Renault, Louis, Nicolas Nassar, Ingrid Vetter, Jörg Becker, Christian Klebe, Michel Roth, and Alfred Wittinghofer. 1998. “The 1.7 Å Crystal Structure of the Regulator of Chromosome Condensation (RCC1) Reveals a Seven-Bladed Propeller.” *Nature* 392 (6671): 97–101. doi:10.1038/32204.

Reusch, Jessica A., Dhananjay M. Nawandar, Kenneth L. Wright, Shannon C. Kenney, and Janet E. Mertz. 2015. “Cellular Differentiation Regulator BLIMP1 Induces Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation in Epithelial and B Cells by Activating Transcription from Both the R and Z Promoters.” *Journal of Virology* 89 (3): 1731–43. doi:10.1128/JVI.02781-14.

Revoltella, R. P., E. Vigneti, A. Fruscalzo, M. Park, G. Ragona, G. Rocchi, and E. Calef. 1989. “Epstein-Barr Virus DNA Sequences in Precursor Monocyte-Macrophage Cell Lines Established from the Bone Marrow of Children with Maturation Defects of Haematopoiesis.” *Journal of General Virology* 70 (5): 1203–15. doi:10.1099/0022-1317-70-5-1203.

Riddick, Gregory, and Ian G. Macara. 2005. “A Systems Analysis of Importin-{alpha}-{beta} Mediated Nuclear Protein Import.” *The Journal of Cell Biology* 168 (7): 1027–38. doi:10.1083/jcb.200409024.

Ritzi, Marion, Kristina Tillack, Jeannine Gerhardt, Elisabeth Ott, Sibille Humme, Elisabeth Kremmer, Wolfgang Hammerschmidt, and Aloys Schepers. 2003. “Complex Protein-DNA Dynamics at the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus.” *Journal of Cell Science* 116 (19): 3971–84. doi:10.1242/jcs.00708.

Roizman, Bernard. 2007. *Family Herpesviridae: A Brief Introduction*.

Roizman, B., and R. J. Whitley. 2001. “The Nine Ages of Herpes Simplex Virus.” *Herpes: The Journal of the IHMF* 8 (1): 23–27.

Roth, G., T. Curiel, and J. Lacy. 1994. “Epstein-Barr Viral Nuclear Antigen 1 Antisense Oligodeoxynucleotide Inhibits Proliferation of Epstein-Barr Virus-Immortalized B Cells.” *Blood* 84 (2): 582–87.

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson. 1977. “DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12): 5463–67.

Saridakis, Vivian, Yi Sheng, Feroz Sarkari, Melissa N. Holowaty, Kathy Shire, Tin Nguyen, Rongguang G. Zhang, *et al.* 2005. “Structure of the p53 Binding Domain of HAUSP/USP7 Bound to Epstein-Barr Nuclear Antigen 1: Implications for EBV-Mediated Immortalization.” *Molecular Cell* 18 (1): 25–36. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.029.

Saridakis, V., Y. Sheng, F. Sarkari, M. N. Holowaty, K. Shire, T. Nguyen, R. G. Zhang, *et al.* 2005. “Structure of the p53 Binding Domain of HAUSP/USP7 Bound to Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 Implications for EBV-Mediated Immortalization.” *Mol Cell* 18 (1): 25–36. doi:10.1016/j.molcel.2005.02.029.

Sarisky, R T, Z Gao, P M Lieberman, E D Fixman, G S Hayward, and S D Hayward. 1996. “A Replication Function Associated with the Activation Domain of the Epstein-Barr Virus Zta Transactivator.” *Journal of Virology* 70 (12): 8340–47.

Schaner Tooley, Christine E., Janusz J. Petkowski, Tara L. Muratore-Schroeder, Jeremy L. Balsbaugh, Jeffrey Shabanowitz, Michal Sabat, Wladek Minor, Donald F. Hunt, and Ian G. Macara. 2010. “NRMT Is an A-N-Methyltransferase That Methylates RCC1 and Retinoblastoma Protein.” *Nature* 466 (July): 1125–28. doi:10.1038/nature09343.

Schepers, Aloys, Marion Ritzi, Kristine Bousset, Elisabeth Kremmer, John L. Yates, Janet Harwood, John F. X. Diffley, and Wolfgang Hammerschmidt. 2001. “Human Origin Recognition Complex Binds to the Region of the Latent Origin of DNA Replication of Epstein–Barr Virus.” *The EMBO Journal* 20 (16): 4588–4602. doi:10.1093/emboj/20.16.4588.

Schepers, A., M. Ritzi, K. Bousset, E. Kremmer, J. L. Yates, J. Harwood, J. F. Diffley, and W. Hammerschmidt. 2001. “Human Origin Recognition Complex Binds to the Region of the Latent Origin of DNA Replication of Epstein-Barr Virus.” *The EMBO Journal* 20 (16): 4588–4602. doi:10.1093/emboj/20.16.4588.

Schmitz, Roland, Ryan M. Young, Michele Ceribelli, Sameer Jhavar, Wenming Xiao, Meili Zhang, George Wright, *et al.* 2012. “Burkitt Lymphoma Pathogenesis and Therapeutic Targets from Structural and Functional Genomics.” *Nature* 490 (7418): 116–20. doi:10.1038/nature11378.

Scrofani, Jacopo, Teresa Sardon, Sylvain Meunier, and Isabelle Vernos. 2015. “Microtubule Nucleation in Mitosis by a RanGTP-Dependent Protein Complex.” *Current Biology: CB* 25 (2): 131–40. doi:10.1016/j.cub.2014.11.025.

Sears, J., J. Kolman, G. M. Wahl, and A. Aiyar. 2003. “Metaphase Chromosome Tethering Is Necessary for the DNA Synthesis and Maintenance of oriP Plasmids but Is Insufficient for Transcription Activation by Epstein-Barr Nuclear Antigen 1.” *J Virol* 77 (21): 11767–80.

Sears, John, John Kolman, Geoffrey M. Wahl, and Ashok Aiyar. 2003. “Metaphase Chromosome Tethering Is Necessary for the DNA Synthesis and Maintenance of oriP Plasmids but Is Insufficient for Transcription Activation by Epstein-Barr Nuclear Antigen 1.” *Journal of Virology* 77 (21): 11767–80. doi:10.1128/JVI.77.21.11767-11780.2003.

Sears, John, Maki Ujihara, Samantha Wong, Christopher Ott, Jaap Middeldorp, and Ashok Aiyar. 2004. “The Amino Terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1 Contains AT Hooks That Facilitate the Replication and Partitioning of Latent EBV Genomes by Tethering Them to Cellular Chromosomes.” *Journal of Virology* 78 (21): 11487–505. doi:10.1128/JVI.78.21.11487-11505.2004.

Sears, J., M. Ujihara, S. Wong, C. Ott, J. Middeldorp, and A. Aiyar. 2004. “The Amino Terminus of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1 Contains AT Hooks That Facilitate the Replication and Partitioning of Latent EBV Genomes by Tethering Them to Cellular Chromosomes.” *J Virol* 78 (21): 11487–505. doi:10.1128/JVI.78.21.11487-11505.2004.

Seitz, Cornelia S., Helen Deng, Kaede Hinata, Qun Lin, and Paul A. Khavari. 2000. “Nuclear Factor κB Subunits Induce Epithelial Cell Growth Arrest.” *Cancer Research* 60 (15): 4085–92.

Sexton, C J, and J S Pagano. 1989. “Analysis of the Epstein-Barr Virus Origin of Plasmid Replication (oriP) Reveals an Area of Nucleosome Sparing That Spans the 3’ Dyad.” *Journal of Virology* 63 (12): 5505–8.

Shah, W. A., R. F. Ambinder, G. S. Hayward, and S. D. Hayward. 1992. “Binding of EBNA-1 to DNA Creates a Protease-Resistant Domain That Encompasses the DNA Recognition and Dimerization Functions.” *J. Virol.* 66 (6): 3355–62.

Shannon-Lowe, Claire, Emily Adland, Andrew I. Bell, Henri-Jacques Delecluse, Alan B. Rickinson, and Martin Rowe. 2009. “Features Distinguishing Epstein-Barr Virus Infections of Epithelial Cells and B Cells: Viral Genome Expression, Genome Maintenance, and Genome Amplification.” *Journal of Virology* 83 (15): 7749–60. doi:10.1128/JVI.00108-09.

Shannon-Lowe, Claire, and Martin Rowe. 2011. “Epstein-Barr Virus Infection of Polarized Epithelial Cells via the Basolateral Surface by Memory B Cell-Mediated Transfer Infection.” *PLoS Pathog* 7 (5): e1001338. doi:10.1371/journal.ppat.1001338.

Sheu. 2009. “Expression of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 in Gastric Carcinoma Cells Is Associated with Enhanced Tumorigenicity and Reduced Cisplatin Sensitivity.” *International Journal of Oncology* 36 (01). doi:10.3892/ijo_00000486.

Sheu, Lai-Fa, Ann Chen, Ching-Liang Meng, Kuo-Chieh Ho, Wei-Hwa Lee, Fur-Jiang Leu, and Chung-Faye Chao. 1996. “Enhanced Malignant Progression of Nasopharyngeal Carcinoma Cells Mediated by the Expression of Epstein–Barr Nuclear Antigen 1 in Vivo.” *The Journal of Pathology* 180 (3): 243–48. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199611)180:3<243::AID-PATH655>3.0.CO;2-7.

Shire, Kathy, Derek F. J. Ceccarelli, Tina M. Avolio-Hunter, and Lori Frappier. 1999. “EBP2, a Human Protein That Interacts with Sequences of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Important for Plasmid Maintenance.” *Journal of Virology* 73 (4): 2587–95.

Shire, K., D. F. Ceccarelli, T. M. Avolio-Hunter, and L. Frappier. 1999. “EBP2, a Human Protein That Interacts with Sequences of the Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Important for Plasmid Maintenance.” *J Virol* 73 (4): 2587–95.

Silljé, Herman H. W., Susanna Nagel, Roman Körner, and Erich A. Nigg. 2006. “HURP Is a Ran-Importin B-Regulated Protein That Stabilizes Kinetochore Microtubules in the Vicinity of Chromosomes.” *Current Biology* 16 (8): 731–42. doi:10.1016/j.cub.2006.02.070.

Sinclair, Alison J. 2003. “bZIP Proteins of Human Gammaherpesviruses.” *Journal of General Virology* 84 (8): 1941–49. doi:10.1099/vir.0.19112-0.

Singh, Gyanendra, Siddhesh Aras, Arnold H. Zea, Shahriar Koochekpour, and Ashok Aiyar. 2009. “Optimal Transactivation by Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 Requires the UR1 and ATH1 Domains.” *J. Virol.* 83 (9): 4227–35. doi: 10.1128/JVI.02578-08 .

Sivachandran, N., J. Y. Cao, and L. Frappier. 2010. “Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Hijacks the Host Kinase CK2 to Disrupt PML Nuclear Bodies.” *J Virol* 84 (21): 11113–23. doi:10.1128/JVI.01183-10.

Sivachandran, Nirojini, Jennifer Yinuo Cao, and Lori Frappier. 2010. “Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Hijacks the Host Kinase CK2 To Disrupt PML Nuclear Bodies.” *Journal of Virology* 84 (21): 11113–23. doi:10.1128/JVI.01183-10.

Sixbey, J. W., and Q. Y. Yao. 1992. “Immunoglobulin A-Induced Shift of Epstein-Barr Virus Tissue Tropism.” *Science (New York, N.Y.)* 255 (5051): 1578–80.

Snudden, D. K., P. R. Smith, D. Lai, M. H. Ng, and B. E. Griffin. 1995. “Alterations in the Structure of the EBV Nuclear Antigen, EBNA1, in Epithelial Cell Tumours.” *Oncogene* 10 (8): 1545–52.

Song, Xin, Yong-Guang Tao, Xi-Yun Deng, Xin Jin, Yun-Nian Tan, Min Tang, Qiao Wu, Leo M Lee, and Ya Cao. 2004. “Heterodimer Formation between c-Jun and Jun B Proteins Mediated by Epstein–Barr Virus Encoded Latent Membrane Protein 1.” *Cellular Signalling* 16 (10): 1153–62. doi:10.1016/j.cellsig.2004.03.014.

Stevens, Tim J., and Max Paoli. 2008. “RCC1-like Repeat Proteins: A Pangenomic, Structurally Diverse New Superfamily of B-Propeller Domains.” *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 70 (2): 378–87. doi:10.1002/prot.21521.

Sugden, B., and N. Warren. 1989. “A Promoter of Epstein-Barr Virus That Can Function during Latent Infection Can Be Transactivated by EBNA-1, a Viral Protein Required for Viral DNA Replication during Latent Infection.” *Journal of Virology* 63 (6): 2644–49.

Summers, H, J A Barwell, R A Pfuetzner, A M Edwards, and L Frappier. 1996. “Cooperative Assembly of EBNA1 on the Epstein-Barr Virus Latent Origin of Replication.” *Journal of Virology* 70 (2): 1228–31.

Swenson, Jennifer J., Elizabeth Holley-Guthrie, and Shannon C. Kenney. 2001. “Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BRLF1 Interacts with CBP, Promoting Enhanced BRLF1 Transactivation.” *Journal of Virology* 75 (13): 6228–34. doi:10.1128/JVI.75.13.6228-6234.2001.

Swenson, Jennifer J., Amy E. Mauser, William K. Kaufmann, and Shannon C. Kenney. 1999. “The Epstein-Barr Virus Protein BRLF1 Activates S Phase Entry through E2F1 Induction.” *Journal of Virology* 73 (8): 6540–50.

Tabiasco, Julie, Alain Vercellone, Fabienne Meggetto, Denis Hudrisier, Pierre Brousset, and Jean-Jacques Fournié. 2003. “Acquisition of Viral Receptor by NK Cells Through Immunological Synapse.” *The Journal of Immunology* 170 (12): 5993–98. doi:10.4049/jimmunol.170.12.5993.

Tangye, Stuart G. 2014. “XLP: Clinical Features and Molecular Etiology due to Mutations in SH2D1A Encoding SAP.” *Journal of Clinical Immunology* 34 (7): 772–79. doi:10.1007/s10875-014-0083-7.

Tanner, Jerome, Janis Weis, Douglas Fearon, Young Whang, and Elliott Kieff. 1987. “Epstein-Barr Virus gp350/220 Binding to the B Lymphocyte C3d Receptor Mediates Adsorption, Capping, and Endocytosis.” *Cell* 50 (2): 203–13. doi:10.1016/0092-8674(87)90216-9.

Tarrant-Elorza, Margaret, Cyprian C. Rossetto, and Gregory S. Pari. 2014. “Maintenance and Replication of the Human Cytomegalovirus Genome during Latency.” *Cell Host & Microbe* 16 (1): 43–54. doi:10.1016/j.chom.2014.06.006.

Taylor, Graham S., Hui Jia, Kevin Harrington, Lip Wai Lee, James Turner, Kristin Ladell, David A. Price, *et al.* 2014. “A Recombinant Modified Vaccinia Ankara Vaccine Encoding Epstein–Barr Virus (EBV) Target Antigens: A Phase I Trial in UK Patients with EBV-Positive Cancer.” *Clinical Cancer Research* 20 (19): 5009–22. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1122-T.

Tellam, Judy, Mark H. Fogg, Michael Rist, Geoff Connolly, David Tscharke, Natasha Webb, Lea Heslop, Fred Wang, and Rajiv Khanna. 2007. “Influence of Translation Efficiency of Homologous Viral Proteins on the Endogenous Presentation of CD8+ T Cell Epitopes.” *The Journal of Experimental Medicine* 204 (3): 525–32. doi:10.1084/jem.20062508.

Tellam, Judy, Corey Smith, Michael Rist, Natasha Webb, Leanne Cooper, Tony Vuocolo, Geoff Connolly, David C. Tscharke, Michael P. Devoy, and Rajiv Khanna. 2008. “Regulation of Protein Translation through mRNA Structure Influences MHC Class I Loading and T Cell Recognition.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (27): 9319–24. doi:10.1073/pnas.0801968105.

Tellam, Judy T., Lea Lekieffre, Jie Zhong, David J. Lynn, and Rajiv Khanna. 2012. “Messenger RNA Sequence Rather than Protein Sequence Determines the Level of Self-Synthesis and Antigen Presentation of the EBV-Encoded Antigen, EBNA1.” *PLoS Pathogens* 8 (12). doi:10.1371/journal.ppat.1003112.

Tempera, Italo, Zhong Deng, Constandache Atanasiu, Chi-Ju Chen, Maria D’Erme, and Paul M. Lieberman. 2010. “Regulation of Epstein-Barr Virus OriP Replication by Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1” 84 (10): 4988–97. doi:10.1128/JVI.02333-09.

Thorley-Lawson, David A. 2001. “Epstein-Barr Virus: Exploiting the Immune System.” *Nature Reviews Immunology* 1 (1): 75–82. doi:10.1038/35095584.

———. 2005. “EBV the Prototypical Human Tumor Virus--Just How Bad Is It?” *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 116 (2): 251–61. doi:16/j.jaci.2005.05.038.

Torosantucci, Liliana, Maria De Luca, Giulia Guarguaglini, Patrizia Lavia, and Francesca Degrassi. 2008. “Localized RanGTP Accumulation Promotes Microtubule Nucleation at Kinetochores in Somatic Mammalian Cells.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (5): 1873–82. doi:10.1091/mbc.E07-10-1050.

Tsai, Kevin, Lilian Chan, Rebecca Gibeault, Kristen Conn, Jayaraju Dheekollu, John Domsic, Ronen Marmorstein, Luis M. Schang, and Paul M. Lieberman. 2014. “Viral Reprogramming of the Daxx-Histone H3.3 Chaperone During EBV Early Infection.” *Journal of Virology*, October, JVI.01895–14. doi:10.1128/JVI.01895-14.

Tse, Eric, and Yok-Lam Kwong. 2015. “Epstein Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases: The Virus as a Therapeutic Target.” *Experimental & Molecular Medicine* 47 (1): e136. doi:10.1038/emm.2014.102.

Tugizov, Sharof M., Rossana Herrera, and Joel M. Palefsky. 2013. “Epstein-Barr Virus Transcytosis through Polarized Oral Epithelial Cells.” *Journal of Virology* 87 (14): 8179–94. doi:10.1128/JVI.00443-13.

Tzellos, Stelios, and Paul J. Farrell. 2012. “Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease.” *Pathogens* 1 (2): 156–75. doi:10.3390/pathogens1020156.

Uchida, S., T. Sekiguchi, H. Nishitani, K. Miyauchi, M. Ohtsubo, and T. Nishimoto. 1990a. “Premature Chromosome Condensation Is Induced by a Point Mutation in the Hamster RCC1 Gene.” *Mol Cell Biol* 10 (2): 577–84.

Uchida, S, T Sekiguchi, H Nishitani, K Miyauchi, M Ohtsubo, and T Nishimoto. 1990b. “Premature Chromosome Condensation Is Induced by a Point Mutation in the Hamster RCC1 Gene.” *Molecular and Cellular Biology* 10 (2): 577–84.

Valentine, Robert, Christopher W. Dawson, Chunfang Hu, Khilan M. Shah, Thomas J. Owen, Kathryn L. Date, Sonia P. Maia, *et al.* 2010. “Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA1 Inhibits the Canonical NF-κB Pathway in Carcinoma Cells by Inhibiting IKK Phosphorylation.” *Molecular Cancer* 9 (1): 1. doi:10.1186/1476-4598-9-1.

Vereide, David T., and Bill Sugden. 2011. “Lymphomas Differ in Their Dependence on Epstein-Barr Virus.” *Blood* 117 (6): 1977–85. doi:10.1182/blood-2010-05-285791.

Verma, S. C., K. Lan, and E. Robertson. 2007. “Structure and Function of Latency-Associated Nuclear Antigen.” *Current Topics in Microbiology and Immunology* 312: 101.

Verweij, Marieke C., Daniëlle Horst, Bryan D. Griffin, Rutger D. Luteijn, Andrew J. Davison, Maaike E. Ressing, and Emmanuel J. H. J. Wiertz. 2015. “Viral Inhibition of the Transporter Associated with Antigen Processing (TAP): A Striking Example of Functional Convergent Evolution.” *PLoS Pathog* 11 (4): e1004743. doi:10.1371/journal.ppat.1004743.

Voisset, Cécile, Chrysoula Daskalogianni, Marie-Astrid Contesse, Anne Mazars, Hratch Arbach, Marie Le Cann, Flavie Soubigou, Sébastien Apcher, Robin Fåhraeus, and Marc Blondel. 2014. “A Yeast-Based Assay Identifies Drugs That Interfere with Immune Evasion of the Epstein-Barr Virus.” *Disease Models & Mechanisms* 7 (4): 435–44. doi:10.1242/dmm.014308.

Wang, Jindong, Scott E. Lindner, Elizabeth R. Leight, and Bill Sugden. 2006. “Essential Elements of a Licensed, Mammalian Plasmid Origin of DNA Synthesis.” *Molecular and Cellular Biology* 26 (3): 1124–34. doi:10.1128/MCB.26.3.1124-1134.2006.

Wang, Wen-Hung, Li-Kwan Chang, and Shih-Tung Liu. 2011. “Molecular Interactions of Epstein-Barr Virus Capsid Proteins.” *Journal of Virology* 85 (4): 1615–24. doi:10.1128/JVI.01565-10.

Wang, Wen-Yi, Yi-Chih Chien, Jian-Sheng Jan, Chun-Mei Chueh, and Jin-Ching Lin. 2002. “Consistent Sequence Variation of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Primary Tumor and Peripheral Blood Cells of Patients with Nasopharyngeal Carcinoma.” *Clinical Cancer Research* 8 (8): 2586–90.

Weaver, Lesley N., Stephanie C. Ems-McClung, Sez-Hon R. Chen, Ge Yang, Sidney L. Shaw, and Claire E. Walczak. 2015. “The Ran-GTP Gradient Spatially Regulates XCTK2 in the Spindle.” *Current Biology*. Accessed May 23. doi:10.1016/j.cub.2015.04.015.

Wilson, Angus C., and Ian Mohr. 2012. “A Cultured Affair: HSV Latency and Reactivation in Neurons.” *Trends in Microbiology* 20 (12): 604–11. doi:10.1016/j.tim.2012.08.005.

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.” *The EMBO Journal* 15 (12): 3117–26.

Woisetschlaeger, M, J L Strominger, and S H Speck. 1989. “Mutually Exclusive Use of Viral Promoters in Epstein-Barr Virus Latently Infected Lymphocytes.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (17): 6498–6502.

Wong, Chi-Hang, Hei Chan, Chin-Yee Ho, Soak-Kuan Lai, Kheng-Sze Chan, Cheng-Gee Koh, and Hoi-Yeung Li. 2009. “Apoptotic Histone Modification Inhibits Nuclear Transport by Regulating RCC1.” *Nature Cell Biology* 11 (1): 36–45. doi:10.1038/ncb1810.

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 (19): 8893–8903.

Wu, Hong, Priya Kapoor, and Lori Frappier. 2002. “Separation of the DNA Replication, Segregation, and Transcriptional Activation Functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1.” *Journal of Virology* 76 (5): 2480–90.

Wu, Zhige, Qing Jiang, Paul R. Clarke, and Chuanmao Zhang. 2013. “Phosphorylation of Crm1 by CDK1–cyclin-B Promotes Ran-Dependent Mitotic Spindle Assembly.” *Journal of Cell Science* 126 (15): 3417–28. doi:10.1242/jcs.126854.

Wykes, Michelle N., Joshua M. Horne-Debets, Chiuan-Yee Leow, and Deshapriya S. Karunarathne. 2014. “Malaria Drives T Cells to Exhaustion.” *Microbial Immunology* 5: 249. doi:10.3389/fmicb.2014.00249.

Wysokenski, D. A., and J. L. Yates. 1989a. “Multiple EBNA1-Binding Sites Are Required to Form an EBNA1-Dependent Enhancer and to Activate a Minimal Replicative Origin within oriP of Epstein-Barr Virus.” *Journal of Virology* 63 (6): 2657–66.

Xiao, Bingyi, Subhash C. Verma, Qiliang Cai, Rajeev Kaul, Jie Lu, Abhik Saha, and Erle S. Robertson. 2010. “Bub1 and CENP-F Can Contribute to Kaposi’s Sarcoma-Associated Herpesvirus Genome Persistence by Targeting LANA to Kinetochores.” *Journal of Virology* 84 (19): 9718–32. doi:10.1128/JVI.00713-10.

Xiao, Jianqiao, Joel M. Palefsky, Rossana Herrera, and Sharof M. Tugizov. 2007. “Characterization of the Epstein–Barr Virus Glycoprotein BMRF-2.” *Virology* 359 (2): 382–96. doi:10.1016/j.virol.2006.09.047.

Yasuda, Ai, Kohji Noguchi, Masafumi Minoshima, Gengo Kashiwazaki, Teru Kanda, Kazuhiro Katayama, Junko Mitsuhashi, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama, and Yoshikazu Sugimoto. 2011. “DNA Ligand Designed to Antagonize EBNA1 Represses Epstein–Barr Virus-Induced Immortalization.” *Cancer Science* 102 (12): 2221–30. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02098.x.

Yates, J. L., and N. Guan. 1991. “Epstein-Barr Virus-Derived Plasmids Replicate Only Once per Cell Cycle and Are Not Amplified after Entry into Cells.” *Journal of Virology* 65 (1): 483–88.

Yates, J. L., N. Warren, and B. sugden. 1985. “Stable Replication of Plasmids Derived from Epstein-Barr Virus in Various Mammalian Cells.” *Nature* 313: 812–15.

Yates, J. L., N. Warren, and B. Sugden. 1985. “Stable Replication of Plasmids Derived from Epstein-Barr Virus in Various Mammalian Cells.” *Nature* 313 (6005): 812–15.

Yates, J, N Warren, D Reisman, and B Sugden. 1984a. “A Cis-Acting Element from the Epstein-Barr Viral Genome That Permits Stable Replication of Recombinant Plasmids in Latently Infected Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (12): 3806–10.

Yates, J., N. Warren, D. Reisman, and B. Sugden. 1984b. “A Cis-Acting Element from the Epstein-Barr Viral Genome That Permits Stable Replication of Recombinant Plasmids in Latently Infected Cells.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81 (12): 3806–10.

Yin, Yili, Bénédicte Manoury, and Robin Fåhraeus. 2003. “Self-Inhibition of Synthesis and Antigen Presentation by Epstein-Barr Virus-Encoded EBNA1.” *Science* 301 (5638): 1371–74. doi:10.1126/science.1088902.

Yoshizaki, Tomokazu, Makoto Ito, Shigekyuki Murono, Naohiro Wakisaka, Satoru Kondo, and Kazuhira Endo. 2012. “Current Understanding and Management of Nasopharyngeal Carcinoma.” *Auris Nasus Larynx* 39 (2): 137–44. doi:10.1016/j.anl.2011.02.012.

You, Jianxin. 2010. “Papillomavirus Interaction with Cellular Chromatin.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Chromatin in viral Gene Expression, 1799 (3–4): 192–99. doi:10.1016/j.bbagrm.2009.09.009.

Young, L. S., R. Lau, M. Rowe, G. Niedobitek, G. Packham, F. Shanahan, D. T. Rowe, D. Greenspan, J. S. Greenspan, and A. B. Rickinson. 1991. “Differentiation-Associated Expression of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Transactivator Protein in Oral Hairy Leukoplakia.” *Journal of Virology* 65 (6): 2868–74.

Zalani, S, E Holley-Guthrie, and S Kenney. 1996. “Epstein-Barr Viral Latency Is Disrupted by the Immediate-Early BRLF1 Protein through a Cell-Specific Mechanism.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (17): 9194–99.

Zeng. 2010. “The Enhanced Transcriptional Activity of the V-Val Subtype of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 in Epithelial Cell Lines.” *Oncology Reports* 23 (5). doi:10.3892/or_00000779.

Zhang, Chuanmao, Martin W. Goldberg, William J. Moore, Terence D. Allen, and Paul R. Clarke. 2002. “Concentration of Ran on Chromatin Induces Decondensation, Nuclear Envelope Formation and Nuclear Pore Complex Assembly.” *European Journal of Cell Biology* 81 (11): 623–33. doi:10.1078/0171-9335-00288.

Zhang, Michael Shaofei, Alexei Arnaoutov, and Mary Dasso. 2014a. “RanBP1 Governs Spindle Assembly by Defining Mitotic Ran-GTP Production.” *Developmental Cell* 31 (4): 393–404. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.014.

Zhang, Michael Shaofei, Alexei Arnaoutov, and Mary Dasso. 2014b. “RanBP1 Governs Spindle Assembly by Defining Mitotic Ran-GTP Production.” *Developmental Cell* 31 (4): 393–404. doi:10.1016/j.devcel.2014.10.014.

Zhang, Q, Y Hong, D Dorsky, E Holley-Guthrie, S Zalani, N A Elshiekh, A Kiehl, T Le, and S Kenney. 1996. “Functional and Physical Interactions between the Epstein-Barr Virus (EBV) Proteins BZLF1 and BMRF1: Effects on EBV Transcription and Lytic Replication.” *Journal of Virology* 70 (8): 5131–42.

Zheng, Gang, Michal-Ruth Schweiger, Gustavo Martinez-Noel, Leon Zheng, Jennifer A Smith, J. Wade Harper, and Peter M Howley. 2009. “Brd4 Regulation of Papillomavirus Protein E2 Stability.” *Journal of Virology* 83 (17): 8683–92. doi:10.1128/JVI.00674-09.

Zhou, Jing, Zhong Deng, Julie Norseen, and Paul M. Lieberman. 2010. “Regulation of Epstein-Barr Virus Origin of Plasmid Replication (OriP) by the S-Phase Checkpoint Kinase Chk2.” *Journal of Virology* 84 (10): 4979–87. doi:10.1128/JVI.01300-09.

Zhou, Jing, Andrew R. Snyder, and Paul M. Lieberman. 2009. “Epstein-Barr Virus Episome Stability Is Coupled to a Delay in Replication Timing.” *Journal of Virology* 83 (5): 2154–62. doi:10.1128/JVI.02115-08.

Zimber, U., H. K. Adldinger, G. M. Lenoir, M. Vuillaume, M. V. Knebel-Doeberitz, G. Laux, C. Desgranges, P. Wittmann, U. K. Freese, and U. Schneider. 1986. “Geographical Prevalence of Two Types of Epstein-Barr Virus.” *Virology* 154 (1): 56–66.

Annexe bibliographique

I. Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A modulates cellular gene transcription through interaction with Miz-1

Afin de mieux comprendre l'action des protéines EBNA3 au niveau moléculaire, nous avons cherché à identifier de nouveaux partenaires cellulaires pour les trois protéines virales EBNA-3A, -3B et -3C. A l'aide d'un crible deux-hybrides en levure, nous avons identifié la protéine Miz-1, facteur de transcription originellement identifié comme un partenaire de l'oncoprotéine c-Myc, comme un partenaire potentiel des protéines EBNA3. Miz-1 joue un rôle dans l'arrêt de la transcription en transactivant ses gènes cibles incluant CDKN1A, CDKN1C et CDKN2B. Nous avons confirmé l'interaction entre les trois protéines EBNA3 et Miz-1 in vitro par des expériences de GST-pull down ainsi que par co-immunoprécipitation en cellules HeLa. Nous nous sommes ensuite plus particulièrement intéressés à la protéine EBNA-3A et nous avons montré que Miz-1 interagit avec EBNA-3A dans le système plus physiologique des lignées lymphoblastoïdes (LCL) dans lesquelles l'ensemble des protéines de latence sont exprimées et que EBNA-3A relocalise Miz-1 du cytoplasme vers le noyau des cellules. Nous avons ensuite étudié l'effet de la protéine virale EBNA-3A sur l'activation de la transcription induite par Miz-1. Pour cela, nous avons comparé le niveau des transcrits de certains gènes cibles de Miz-1 par RT-qPCR dans des LCL exprimant ou non EBNA-3A. De manière intéressante certains gènes codant des inhibiteurs du cycle cellulaire (dont CDKN2B) sont différemment exprimés en présence d'EBNA-3A. Enfin, nous avons pu montrer que la protéine virale EBNA-3A est capable de réprimer l'activation de la transcription de Miz-1 en inhibant le recrutement d'une de ses protéines co-activatrices, la protéine NPM. Ces résultats permettent de mieux comprendre les mécanismes par lesquels les protéines EBNA3 et plus largement EBV, dérégulent le cycle cellulaire.

II. Epstein-Barr Virus Late Gene Transcription Depends on the Assembly of a Virus-Specific Preinitiation Complex

Le cycle productif des herpesvirus est caractérisé par une expression successive et régulée des gènes immédiats précoces, précoces et tardifs. La structure des promoteurs entre les différentes classes de gènes diffère profondément. Les promoteurs de gènes immédiats précoces et précoces possèdent des régions cis-régulatrices en amont d'une boite TATA tandis que les promoteurs des gènes tardifs n'en contient qu'une seule. Dans le cas des gammaherpesvirus, cette séquence est le plus souvent une boite TATT en lieu et place de la boite TATA canonique. Le génome d'EBV code pour une protéine, BcRF1, qui est l'homologue structural de la TBP (*TATA Binding Protein*) et interagit spécifiquement avec les régions TATT. BcRF1 est nécessaire n'est pas suffisante à l'expression des gènes tardifs d'EBV suggérant la nécessite d'autres protéines virales. Au cours de ce travail, nous avons identifié et caractérisé un complexe de protéines virales nécessaire et suffisant pour l'expression des gènes viraux tardifs. Ce complexe se compose de 5 protéines différentes en plus de BcRF1 interagissant avec l'ARN polymérase II. Au cours du cycle productif, ce complexe que nous avons nommé vPIC (pour *viral Pre-Initiation Complex*), fonctionne en parallèle de la machinerie de réplication de l'ADN viral afin d'activer l'expression des gènes tardifs. Les protéines du vPIC d'EBV possèdent des homologues chez les béta- et gammaherpesvirus mais pas chez les alphaherpesvirus. Nous résultats indiquent que les beta- et gammaherpesvirus codent pour leurs propres complexes de pré-initiation de la transcription responsable de l'expression des gènes viraux tardifs ainsi qu'une histoire évolutive proche pour ces virus.