

## Journée Scientifique de l'association HerPAS, Paris le 28 mars 2012

L'association HerPAS qui a pour but de fédérer un réseau de recherche portant sur l'ensemble des herpesvirus a organisé sa première journée scientifique le 28 Mars dernier à l'Institut Pasteur de Paris avec l'aide de la société Argene. L'objectif de cette journée était de réunir les chercheurs travaillant dans le domaine des herpesvirus, afin de faire un tour d'horizon des travaux menés actuellement et de stimuler des coopérations scientifiques. Cette journée fut un grand succès puisque plus de 70 chercheurs se sont retrouvés pour suivre les différentes présentations portant soit sur des aspects de recherche cliniques notamment sur le virus d'Epstein-Barr, soit sur des aspects plus fondamentaux concernant la biologie des différents herpesvirus. HSV-1, HHV6, VZV, EBV et CMV pour les virus humains ont été bien documentés, tout comme le virus de la maladie de Marek du poulet MDV. Nous vous proposons ici un cours résumé des principales présentations qui ont été faites pendant cette journée. Pour plus de précisions concernant l'Association HerPAS (Herpesvirus et Pathologies Associées) je vous invite à visiter notre site web : <http://assos-herpas.ens-lyon.fr/> Contact : [henri.gruffat@ens-lyon.fr](mailto:henri.gruffat@ens-lyon.fr)

### Interactions entre le Multiple Sclerosis associated Retrovirus et le virus d'Epstein-Barr dans la sclérose en plaques. *N Morel<sup>1,2,3</sup>, R Germi<sup>1,2</sup>, O Epaulard<sup>1,4</sup>, O Casez<sup>3</sup>, L Grossi<sup>1</sup>, P Morand<sup>1,2,3</sup> et H Perron<sup>5</sup>.*

(<sup>1</sup> Unit of virus Host cell interaction UMI 3265 UJF-CNRS EMBL, Grenoble; <sup>2</sup> Laboratoire de virologie, CHU Grenoble; <sup>3</sup> Service de Neurologie, CHU Grenoble, <sup>4</sup> Service d'infectiologie, CHU Grenoble, <sup>5</sup> Geneuro SA, Plan les Ouates Suisse)

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire, démyélinisante et neurodégénérative du système nerveux central déclenchée par des facteurs environnementaux chez des sujets génétiquement prédisposés. Il existe des arguments importants concernant l'implication du Virus d'Epstein-Barr et du MSR/V (*Multiple Sclerosis Associated Retrovirus*) dans la survenue d'une SEP.

La mononucléose infectieuse est associée à un risque 2 fois plus élevé de développer une SEP. Les titres d'anticorps anti-EBNA1 et le nombre de lymphocytes T CD8 anti-EBV sont plus élevés chez les patients SEP que dans la population générale. L'EBV est présent dans les lésions cérébrales de SEP. Le MSR/V est un rétrovirus endogène de la famille HERV-W. L'expression du MSR/V est détectée de manière beaucoup plus fréquente dans le sang, le LCR et le cerveau chez les patients SEP que dans la population générale. L'expression de la protéine d'enveloppe de MSR/V (MSR/V-ENV) semble au cœur des phénomènes inflammatoires observés dans la SEP, du fait de ses propriétés de superantigène et de ligand du TLR-4. Des anticorps monoclonaux humanisés anti-MSR/V ENV sont efficaces chez la souris et actuellement en essai de phase 2.

Nous avons mis au point des techniques de quantification de MSR/V ENV (ARNm et protéine). Le travail en cours consiste à démontrer que l'EBV, au cours de la primo-infection ou des réactivations virales, est un facteur permettant l'expression anormale de MSR/V ENV pour faire ainsi un lien entre ces deux virus dans la survenue d'une SEP.

### Intégration chromosomique de l'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) chez des patients d'hématologie. *Claire Laforest, Mustafa Al Jawhari, Estelle Troadec, Catherine Yardin, Nathalie Gachard, Pascal Turlure, Nataliya Dmytruk, Arnaud Jaccard, Maryline Debette-Gratien, Sylvie Ranger-Rogez.* (Centre Hospitalier Universitaire Dupuytren, Limoges)

L'herpèsvirus humain de type 6 (HHV-6) peut s'intégrer au niveau des télomères des chromosomes humains. Le virus intégré (CiHHV-6) semble être transmis par l'un des parents et concerne la totalité des cellules. Une partie des cas décrits concerne des patients atteints d'hémopathies.

L'étude a porté sur 163 patients prélevés au cours du 1<sup>er</sup> trimestre 2011 (moyenne d'âge : 56 ans), atteints de diverses pathologies (81 lymphomes, 46 leucémies, 36 autres).

Les patients présentant une charge virale > 6 log dans le sang total sur plusieurs prélèvements ont été considérés comme portant du CiHHV-6. Nous avons recherché :

- la visualisation de l'intégration (sondes HHV-6 marquées par nick translation),
- la localisation du CiHHV-6 (double marquage),
- la caractérisation du virus (A/B)

Sur les 163 patients trois étaient positifs (1,8%) et montraient :

- HHV-6A intégré dans le chromosome 17 (thrombopénie profonde au cours d'une cirrhose B delta).
- HHV-6B intégré dans le chromosome 17 (LLC en rémission complète)
- HHV-6B intégré dans le chromosome 20 (lymphome B à grandes cellules, EBV +)

L'incidence du CiHHV-6 est donc similaire à celle décrite dans d'autres pays. Les patients positifs souffraient de pathologies très différentes et la localisation sur le chromosome 17, déjà rapportée plusieurs fois dans la littérature, est la plus fréquente.

*Lymphomes NKT et EBV*

*Intervenant : Jean Feuillard (Limoges)*

## **Une place pour des approches antivirales ? Lymphome Hodgkinien du sujet âgé et EBV. Caroline Besson** (Service d'Hématologie et Immunologie Biologiques, Cytogénétique, Hôpital Bicêtre, Assistance Publique–Hôpitaux de Paris, Le Kremlin-Bicêtre)

Le Lymphome de Hodgkin (LH) présente une courbe de fréquence bimodale avec deux pics d'incidence, le premier chez le jeune adulte, le second chez le sujet âgé de plus de 60 ans. Le LH est associé dans 20 à 30% des cas au virus d'Epstein Barr (EBV), cette association est plus fréquente chez le sujet âgé (50% des cas après 60 ans). Le virus est impliqué dans la physiopathologie des LH associés à EBV (LH-EBV), les oncogènes viraux LMP1 et LMP2 mimant l'activation des récepteurs CD40 et BCR. Il a été décrit que seuls les gènes viraux codant les protéines LMP1, LMP2 et EBNA-1 sont exprimés dans les LH-EBV. Cependant, les sujets atteints de LH-EBV ont fréquemment une charge virale EBV détectable dans le sérum, dont l'évolution est corrélée avec celle de la maladie, ce qui suggère un certain niveau de réplication virale. Par ailleurs, le génome viral peut représenter une cible thérapeutique spécifique de la tumeur. Le traitement classique du LH repose sur une polychimiothérapie qui ne tient pas compte de la présence ou non de l'EBV *in situ*. Il a pourtant été montré, chez le sujet âgé de plus de 60 ans, que l'EBV était un facteur pronostic défavorable ce qui justifie la recherche de nouvelles approches thérapeutiques. L'impact de traitements antiviraux sur l'évolution du LH-EBV n'a pas encore été étudié. Il existe pourtant des arguments clinico-biologiques en faveur de l'efficacité d'une approche antivirale dans d'autres lymphomes associés à l'EBV. Ainsi, un traitement antiviral diminue l'incidence des lymphomes post-transplantation chez des patients à risque et une synergie entre une chimiothérapie anti-tumorale utilisée dans le traitement du LH (l'adriamycine) et un traitement antiviral (le ganciclovir) a été décrite *in vitro*. Nous souhaitons évaluer *in vitro* et *in vivo* l'efficacité et le mode d'action de l'association d'un traitement antiviral et d'une chimiothérapie antitumorale au cours du LH-EBV dans le cadre d'un essai thérapeutique pilote mené chez des patients âgés de 60 ans ou plus et atteints de LH-EBV.

## **Réactivation précoce de l'EBV après transplantation d'organe ou de cellules souches. Jérôme LEGOFF.** (Université Paris Diderot – Hôpital Saint-Louis – Inserm U941)

Les réactivations du virus Epstein-Barr (EBV) après allogreffe de cellules hématopoïétiques ou après transplantation d'organe sont des facteurs importants de morbidité et de mortalité. Les lymphoproliférations induites par le virus EBV surviennent fréquemment dans un délai de quelques semaines à quelques mois après transplantation ; 1 à 3 mois pour les cellules hématopoïétiques et de 2 à 12 mois pour les organes solides. Les lymphoproliférations sont un facteur de risque important de lymphome malin. La lymphoprolifération B induite par l'EBV est le plus souvent traitée par une immunothérapie avec les anticorps monoclonaux anti-CD20 et parfois par des injections de lymphocytes du donneur, spécifiques ou non. L'immunothérapie anti-CD20 a permis de réduire de façon significative la mortalité. Ce traitement induit toutefois un déficit prolongé en lymphocytes B, un déficit fonctionnel B à long terme, avec un risque accru d'infections opportunistes. L'injection de lymphocytes du donneur augmente le risque de réaction de greffon contre l'hôte (GVHD) et n'est pas réalisable chez les patients en cours de traitement d'une GVHD. L'indication d'une intervention thérapeutique anticipée est établie uniquement en fonction de la charge EBV sanguine et il est le plus souvent supposé que les proliférations sont associées à un virus EBV non répliquatif. Cependant, la quantification des génomes viraux (i) ne permet pas de distinguer entre la prolifération de cellules infectées par un virus en latence et la réplication virale, (ii) n'est pas représentative des événements initiaux survenant dans les ganglions en particulier les amygdales, (iii) admet un seuil d'intervention défini empiriquement entre 4 et 4,5 log<sub>10</sub> copies/ml et parfois considéré comme trop précoce. De

nouvelles stratégies de contrôle des proliférations cellulaires associées à l'EBV sont étudiées (bortezomib, tubacin, ganciclovir, maribavir, CMX001), leur efficacité dépendant étroitement des profils d'expression des gènes viraux. Les observations de réduction du nombre de cellules infectées par EBV suite à l'administration prolongée de valaciclovir chez l'individu immunocompétent et le contrôle des lymphoproliférations par le foscavir chez des patients greffés de cellules souches ne répondant pas à la réduction de l'immunosuppression, les anti-CD20 ou la chimiothérapie suggèrent que des antiviraux plus actifs contre l'EBV pourraient être plus efficaces dans la prévention ou le contrôle des proliférations EBV. Des données sur les profils d'expression EBV après allogreffe de cellules hématopoïétiques ou transplantation d'organe sont nécessaires pour préciser la physiopathologie des proliférations EBV et de rationaliser l'usage des antiviraux et de l'immunothérapie. Une étude nationale multicentrique (EPITOP) sur les proliférations EBV après transplantation pulmonaire chez des receveurs EBV négatifs et EBV positifs est en cours.

Association antiviraux et inhibiteurs de HDAC dans les lymphomes NKT  
*Intervenant : Olivier Hermine (Necker)*

Variabilité génétique et résistance aux antiviraux des alpha et beta herpesvirus humains  
*Intervenant : David Boutolleau (Service de Virologie, Pitié Salpêtrière, Paris)*

**Nasopharyngeal Carcinoma-Derived Exosomes Recruit, Expand and Up-Regulate Biological Activities of Human Regulatory T cells (Treg).** *Dhafer Mrizak, Nathalie Martin, Clément Barjon, Niels Wambre, Toshiro Nikki, Véronique Pancré, Yvan de Launoit, Pierre Busson, Olivier Morales\* and Nadira Delhem\*.* (CNRS UMR 8161, Institut de Biologie de Lille, Université Lille-Nord de France, Institut Pasteur de Lille)

Les exosomes sont présents dans les fluides corporels des patients atteints de cancers et pourraient être impliqués dans la progression tumorale. La fréquence et les fonctions suppressives des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> du sang périphérique (Treg) sont plus élevées chez les patients atteints d'un carcinome du rhinopharynx (NPC) que chez les donneurs sains. Comme les interactions entre les exosomes dérivés de NPC et les Treg restent encore inconnues, nous avons analysé leur capacité à recruter, développer et activer les Treg humains.

Les exosomes isolés à partir de surnageants de lignées de cellules NPC (C15) mais pas à partir du plasma de donneurs sains (HD'Exo) augmentent significativement ( $p \leq 0,05$ ) l'expansion des Treg humains en induisant la génération de Tim3<sup>low</sup>Tregs. NPC-Exo augmentent également le niveau d'expression de CD25<sup>high</sup> et FoxP3<sup>high</sup> sur les Treg et favorisent la conversion de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> en Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>. Lors de la co-incubation avec les NPC-Exo, les Treg ont montré une surexpression de marqueurs de cellules associés au phénotype Treg (L selectin, ICAM1, OX40), aux propriétés immunosuppressives (IL-10, le TGF- $\beta$ 1, le TNF- $\alpha$ , Tbet, granzyme B) et de recrutement (CCR6). Ces résultats sont compatibles avec une plus forte répression de la prolifération des cellules répondant (RC) ( $p \leq 0,001$ ). NPC-Exo facilitent également le recrutement ( $p \leq 0,001$ ) des Treg purifiés qui peuvent être inhibés par anti-CCL20 neutralisant.

Cette étude suggère que les exosomes dérivés de NPC ont des propriétés immunomodulatrices. Ils induisent les Treg, promeuvent leur expansion et augmentent leurs fonctions suppressives et chimioattractives. Les interactions entre les NPC-Exo et Treg représentent un mécanisme nouveau qui pourrait être impliqué dans la régulation de la tolérance périphérique par les tumeurs et dans le support d'échappement au système immunitaire dans le cas du NPC.

**Perturbation de l'homéostasie calcique d'une lignée de cancer du sein par l'EBV.** *Olivier Dellis.* (INSERM U757 – Université Paris Sud, Orsay)

Le virus Epstein-Barr (EBV) infecte préférentiellement les cellules du lignage B, et dans certaines conditions peut induire l'apparition de lymphomes de type Burkitt ou Hodgkin. Or la prolifération cellulaire est un processus directement dépendant de la concentration Ca<sup>2+</sup> cytosolique, elle-même dépendante des entrées de Ca<sup>2+</sup> via les canaux de type Orai1. Nous avons précédemment montré que l'EBV induit une augmentation de l'expression de la protéine Orai1, avec pour conséquence une hausse des entrées Ca<sup>2+</sup> extracellulaires. Cet effet dépend de l'expression de la protéine EBV LMP-1. Lorsqu'il infecte d'autres types de cellules, l'EBV peut aussi induire l'apparition

de carcinomes, comme le carcinome rhino-pharyngé. Il pourrait être aussi associé à des cancers du sein. Nous avons étudié l'effet de l'infection par l'EBV sur l'homéostasie  $Ca^{2+}$  de la lignée de cancer du sein MDA-MB231.

Nos résultats préliminaires montrent que l'EBV induit une augmentation de l'expression d'Orai1, avec là encore une augmentation de l'influx  $Ca^{2+}$ . Cette augmentation est directement corrélable avec l'expression de la protéine virale LMP-1.

Ainsi, dans deux modèles cellulaires très différents, cellules B et cellules épithéliales de canalicule mammaire, l'EBV modifie l'homéostasie  $Ca^{2+}$ , ce qui pourrait modifier l'équilibre sénescence/prolifération de ces cellules.

### **Caractérisation des partenaires cellulaires des protéines EBNA3 du virus EBV. Quentin Bazot, Thibaud Deschamps, Fabrice Mure, Sandrine Duron, Henri Gruffat et Evelyne Manet.** (INSERM U758, ENS-Lyon)

*In vitro*, l'infection de lymphocytes B primaires par EBV conduit à leur immortalisation. Les lignées de cellules qui en résultent sont appelées lignées lymphoblastoïdes (LCL). Dans ces cellules, seules 9 protéines virales sont exprimées et stimulent la prolifération cellulaires. Parmi ces protéines se trouvent les 3 protéines de la famille EBNA3 (-3A, -3B et -3C), protéines connues pour leur rôle dans la régulation de la transcription de gènes viraux et cellulaires.

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels les EBNA3 participent à l'immortalisation des cellules B nous avons réalisé un crible deux-hybrides en levure en utilisant les EBNA3 comme appâts. Ce crible nous a permis d'identifier 25 nouvelles protéines partenaires dont Miz-1, protéine jouant un rôle clef dans l'arrêt du cycle cellulaire par l'activation de gènes cibles dont le gène *CDKN2B* codant une protéine inhibitrice du cycle cellulaire.

La protéine Miz-1 interagit avec les trois protéines EBNA-3 mais plus particulièrement avec la protéine EBNA-3A. EBNA-3A interagit avec le domaine C-terminal de Miz-1 dans une région située après le domaine de liaison à l'ADN de Miz-1. Miz-1 interagit avec le domaine N-terminal d'EBNA-3A (région connue pour son homologie entre les 3 protéines EBNA3). L'utilisation d'un plasmide rapporteur contenant le gène de la Luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *CDKN2B* nous a permis de montrer qu'EBNA-3A inhibe l'activation de ce promoteur par Miz-1. De manière intéressante, l'expression d'une protéine EBNA-3A mutée pour son interaction avec Miz-1 n'est plus capable d'inhiber cette activation Miz-1 dépendante. Enfin, des LCL n'exprimant pas la protéine virale EBNA-3A montre une surexpression du gène *CDKN2B* par rapport à des LCL sauvages. La protéine EBNA-3A est donc capable de réprimer l'activation du gène *CDKN2B* par Miz-1.

### **Etude comparative du transcriptome dans les cellules de lymphome de Burkitt EBV(+) et EBV(-). Rôle d'EBNA-LP dans la régulation de l'expression des gènes cellulaires. Sonia Chélouah et Joëlle Wiels.** (UMR CNRS 8126, IGR, Villejuif)

EBNA-LP (Epstein-Barr Nuclear Antigen-Leader protein) est la première protéine virale avec EBNA-2 à être exprimée lors de l'infection des lymphocytes B par l'EBV. Sa fonction principale est la co-activation, avec EBNA-2, de l'expression de certains gènes cellulaires ou viraux. Il a été montré que le domaine C-terminal d'EBNA-LP n'est pas indispensable à cette fonction de co-activation. Nos résultats récents du transcriptome montrent qu'EBNA-LP seule (quelle soit entière ou tronquée de son domaine C-ter) est capable de réguler l'expression de certains gènes cellulaires indépendamment d'EBNA-2. Ces résultats montrent également que, comme dans le cas de la co-activation d'EBNA-2, le domaine C-ter d'EBNA-LP n'est pas indispensable à sa fonction de régulateur transcriptionnel mais pourrait être important dans la détermination des gènes cibles. Il a été montré que le domaine C-ter d'EBNA-LP est important pour l'immortalisation des cellules B par l'EBV. Nous avons donc vérifié si parmi les gènes régulés par EBNA-LP, certains étaient impliqués dans ce processus. Nos résultats montrent que seule la forme entière d'EBNA-LP est capable d'induire l'expression du gène cellulaire codant pour la protéine ID1 (Inhibitor of DNA binding) qui est impliquée dans l'immortalisation cellulaire. L'expression de ce gène dans les stades précoces d'une infection des cellules B par l'EBV et son implication dans le processus d'immortalisation restent à déterminer.

### **Rôle de NF- $\kappa$ B et c-Myc dans les lymphomes B associés à l'EBV. A Chanut, F Duguet, S Durand-Panteix, A Marfak, I Youlyouz-Marfak, N Gachard, J Feuillard, et N Faumont.** (CNRS UMR-7276, CHU Dupuytren, Université de Limoges, France)

Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est constitutivement actif dans plusieurs lymphomes B agressifs incluant les lymphomes B des immunodéprimés (PTL, *post-transplant lymphoma*) associés au virus d'Epstein-Barr (EBV). Dans les lymphocytes B immortalisés par l'EBV, deux voies de signalisation activent NF- $\kappa$ B : la voie classique et la voie alternative qui permettent respectivement la translocation nucléaire des dimères NF- $\kappa$ B contenant les sous-unités RelA et RelB. L'impact et les rôles de ces voies NF- $\kappa$ B dans les PTL ne sont pas connus. Nous avons déterminé la dynamique de formation des complexes NF- $\kappa$ B et leurs effets fonctionnels sur la prolifération et la survie dans des conditions de sur-expression de RelA, RelB, I $\kappa$ B $\alpha$  (inhibiteur de RelA) et p100 (inhibiteur de RelB). Enfin, grâce à une approche transcriptomique, nous avons mis en évidence des gènes cibles de RelA et/ou RelB dérégulés dans les PTL.

Nos résultats montrent que malgré l'activation de la voie alternative par l'EBV, p100 n'est pas à l'origine de dimères RelB/p52 mais exerce essentiellement une activité répressive sur les dimères RelB/p50. Dans ce contexte, RelA et RelB sont en compétition pour s'associer à p50 conduisant à une inhibition réciproque des deux voies. Les dimères RelA mais pas RelB sont associés à la fois à la survie et la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV. Parmi les gènes cibles de RelA et/ou RelB, 37% sont sur-exprimés uniquement par RelA et sont impliqués dans la prolifération, la survie, l'inflammation et le métabolisme cellulaire. En revanche, seulement 15% de ces gènes sont ciblés par RelB et pourraient favoriser la survie et la dissémination de la tumeur. Nous concluons que la voie classique d'activation des complexes RelA est la voie oncogénique primaire/majeure initiée dans les PTL. Dans ces lymphomes, la voie alternative NF- $\kappa$ B grâce aux dimères RelB pourrait favoriser secondairement la progression tumorale.

### **La protéine immunosuppressive BАРF1 du virus EBV. Tarbouriech, N., Sarun, S., Wintenberger, C., Grossi, L., Gutsche, I., Germi, R., Morand, P. et Burmeister, W.P. (Unit of Virus Host Cell Interactions (UVHCI), UJF-Grenoble 1/EMBL/CNRS UMI 3265)**

La protéine BАРF1 est une glycoprotéine sécrétée du virus Epstein-Barr. Elle interagit avec la cytokine Colony Stimulating Factor 1 (CSF-1 ou m-CSF), une molécule dimérique qui joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation et le chimiotactisme des monocytes-macrophages. La structure tridimensionnelle de BАРF1 a été résolue dans notre laboratoire en 2006, et révèle une structure hexamérique. Mesuré par résonance plasmonique de surface (SPR) nous avons mise en évidence l'affinité inférieure au nano molaire de l'interaction de BАРF1 avec CSF1. Le complexe entre CSF1 et BАРF1 a été caractérisé montrant un rapport stœchiométrique de 3 dimères de CSF1 par hexamère de BАРF1. Ce complexe a été cristallisé et la structure à 7 Å montre une interaction au niveau du domaine N-terminal autour d'un axe d'ordre 2 de BАРF1 avec le feuillet beta de CSF1. Cette interaction a été confirmée par des mutants au niveau de la surface d'interaction de CSF1. Sur CSF1, le site de l'interaction avec BАРF1 est différent de celui de l'interaction avec son récepteur, c-fms. Ceci suggère un mécanisme allostérique d'inhibition par une action de BАРF1 qui rigidifie une conformation du dimère de CSF1 incompatible avec l'interaction avec le récepteur c-fms. Afin de comprendre le rôle de BАРF1 nous travaillons sur la détection de BАРF1 dans des lignées de cellules et des échantillons biologique de patients avec des différentes maladies liées à l'EBV. Un test ELLSA base sur la très haute affinité de CSF1 pour BАРF1 a été mis en place ainsi qu'une détection au niveau de l'ARNm par qRT-PCR. Des expériences préliminaires ont pu détecter la protéine BАРF1 dans des surnageant de quelques lignées cellulaires et dans la salive de patients avec des charges virales EBV élevées. L'ARNm est le plus fortement présent au niveau de lignées cellulaires épithéliales.

### **HMGB1 : une influence de la nécrose sur la réactivation de l'EBV. Vincent Maréchal. (Université Pierre et Marie Curie. Centre de Recherche des Cordeliers Paris)**

Des travaux récents soulignent l'implication probable de l'immunité innée dans l'apparition ou la progression des lymphomes B associés au virus d'Epstein-Barr. L'activation chronique des lymphocytes B par des antigènes microbiens (PAMPS viraux, bactériens et parasitaires) ou cellulaires (DAMPs ou alarmines) pourrait notamment contribuer à expliquer l'émergence des lymphomes B chez des patients exposés de façon récurrente à des infections virales (HIV, VHC) ou parasitaires (paludisme). Notre équipe a démontré qu'HMGB1, une alarmine ubiquitaire libérée par les cellules nécrotiques et certaines cellules immunes activées peut moduler la réactivation du virus d'Epstein-Barr dans des lignées B dérivées de lymphomes de Burkitt. En effet, HMGB1 est capable de réprimer l'induction du cycle viral productif dans des cellules exposées au TGF- $\beta$  ou à des anticorps dirigés

contre les immunoglobulines de surface. Ce processus requiert l'engagement des TLR-2 et -4, largement exprimés dans ces lignées, par HMGB1 ; il aboutit à l'inhibition de la phosphorylation de Erk, une étape essentielle à l'induction de la protéine immédiatement précoce ZEBRA par le TGF- $\beta$ . Cette observation établit pour la première fois que les foyers de nécrose, fréquemment observés dans les tumeurs associées à EBV, pourraient influencer la sensibilité des cellules tumorales à des inducteurs physiologiques de la réactivation virale et donc moduler la balance entre la latence et la réactivation.

### **Architecture nucléaire et contrôle de l'infection latente du virus HSV-1. *Patrick Lomonte.*** (Centre de Génétique et de Physiologie Moléculaire et Cellulaire, UMR5534-CNRS/UCB Lyon1)

Les facteurs de transcription, les modifications épigénétiques de la chromatine, et l'organisation fonctionnelle du noyau sont des aspects importants de la régulation de l'expression de gènes. De nombreux virus établissent une infection persistante pendant laquelle les génomes viraux sont stockés dans le noyau des cellules infectées sous une forme non-intégrée. Le rôle de l'architecture nucléaire sur le contrôle de l'organisation et de la transcription de ces génomes viraux latents n'a cependant jamais été étudié. L'étude du virus neurotrope, herpèsvirus simplex de type 1 (HSV-1), en combinaison avec des approches d'hybridation fluorescente in situ (FISH), et d'analyse par microscopie confocale, nous a permis de démontrer que les génomes viraux latents adoptent des profils nucléaires spécifiques dans les neurones sensoriels de tissus neuronaux issus de souris infectées. Les génomes HSV-1 latents s'associent avec les centromères et les corps PML (PML-NBs ou ND10), et cette association est directement corrélée avec l'absence de transcription de l'ARN LAT (pour Latency Associated Transcript) qui est un marqueur de la latence. Cependant, l'expression du LAT n'est visible que dans environ 20 à 30% des neurones infectés, ce qui montre que la latence d'HSV-1 présente une hétérogénéité forte. L'infection de souris KO pour PML montre que les PML-NBs sont impliqués dans l'acquisition des profils nucléaires du virus latent. De plus, l'absence de la protéine PML augmente la proportion de neurones infectés de manière latente et qui expriment le LAT. De façon générale, cette étude indique que les domaines nucléaires PML-NBs et les centromères sont fonctionnellement impliqués dans le contrôle transcriptionnel du virus HSV-1 latent, et pourraient directement influencer la réactivation du virus. Ceci confère également à HSV-1 un intérêt particulier comme modèle d'étude concernant le positionnement nucléaire d'une entité génique, l'architecture nucléaire et le contrôle de l'expression génique.

### **Modulation de l'autophagie par les Herpesvirus HSV-1 et HCMV. *Marion Lussignol, Lina Mouna, Marie-Françoise Bernet-Camard, Matthieu Bertrand, Dorine Bonte, Audrey Esclatine.*** (INSERM UMR984, Université Paris Sud, Faculté de Pharmacie, Châtenay-Malabry)

L'autophagie est un mécanisme vacuolaire de dégradation du matériel cytoplasmique existant dans toutes les cellules eucaryotes. En plus de son rôle dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, elle a été récemment identifiée comme un mécanisme de défense antivirale. Les Herpèsvirus ont développé différentes stratégies permettant de contrecarrer l'autophagie. Nous avons montré que hCMV module bidirectionnellement l'autophagie. Il stimule l'autophagie aux temps précoces de l'infection indépendamment de toute synthèse virale. Puis, à partir de 24 heures pi, il va mettre en place un système lui permettant de bloquer l'autophagie. Nous avons identifié la protéine virale TRS1 comme responsable, au moins en partie, de ce phénomène. TRS1 est capable d'inhiber l'autophagie en se liant à la protéine de l'autophagie Beclin 1 par sa région N terminale, mais indépendamment de sa fonction sur PKR. HSV-1 est également capable de bloquer l'autophagie et la protéine virale ICP34.5 avait été décrite comme responsable de cet effet. Nous avons mis en évidence que la protéine Us11 possède également des propriétés anti-autophagiques, aussi bien seule que dans un contexte d'infection virale. Elle agit par un nouveau mécanisme d'action : blocage de la kinase PKR et inhibition de la voie de stimulation de l'autophagie PKR-eIF2 $\alpha$ .

### **Caractérisation de la protéine ORF9p du virus de la Varicelle et du Zona. *Laura Riva, Marielle Lebrun, Catherine Sadzot-Delvaux.*** (Laboratoire de Virologie et d'Immunologie, GIGA-R, Université de Liège, Avenue de l'Hôpital, B34, 4000 Liège)

Le virus de la Varicelle et du Zona est un alpha-herpesvirus humain responsable de deux pathologies: la Varicelle et le Zona. Le virus est caractérisé par la présence d'une enveloppe externe

entourant le tégument et la nucléocapside. Le rôle du tégument dans le cycle infectieux et en particulier dans l'assemblage des virions n'est pas clairement défini.

L'ORF9p est une protéine essentielle, constituant le tégument. Son transcrit viral est le plus fortement exprimé au cours de l'infection productive, laissant supposer un rôle important. Cette protéine de 302 acides aminés possède un domaine d'homologie (RH) conservé chez tous les alpha-herpesvirus, mais dont le rôle n'est pas clairement caractérisé.

Nous avons entrepris l'étude de la protéine ORF9p, en transfection d'une part, ou dans un contexte d'infection. La recombinaison homologue en deux étapes, optimisée dans le laboratoire, permet en effet de générer, à partir d'un BAC contenant la totalité du génome viral, des particules virales dans lesquelles la protéine ORF9p est mutée ou taggée, constituant un outil essentiel pour l'étude de cette protéine et des modifications posttraductionnelles qui la caractérisent.

### **Régulation du cycle cellulaire par le virus de la maladie de Marek : implication de la protéine de tégument VP22 dans l'arrêt prolifératif en phase-S et l'induction de dommages à l'ADN. *Trapp-Fraget Laëtitia, Vautherot D., Le Vern Y., Rémy S., Vautherot J.F., Boutet E., Mirey G. et Denesvre C.* (INRA, UR1282, IASP213, Equipe Biologie des Virus Aviaires, Nouzilly)**

L'alpha-herpesvirus de la maladie de Marek, responsable du développement de lymphomes T chez la poule, engendre encore actuellement des pertes économiques importantes dans la filière avicole malgré une vaccination systématique des animaux. La dérégulation du cycle cellulaire est une stratégie communément adoptée par les virus afin de bénéficier d'un environnement favorable à leur réplication. Il nous donc a semblé intéressant de déterminer l'impact de l'infection par le MDV sur la régulation du cycle cellulaire. L'infection de cellules primaires de peau de poulet (CESC) initialement quiescentes (phase-G0) par le MDV, provoque non seulement leur réentrée dans le cycle cellulaire, mais induit également un arrêt de la progression du cycle en phase S (phase de réplication de l'ADN cellulaire). Nous avons identifié la protéine de tégument VP22, essentielle à la réplication du virus, comme un régulateur majeur du cycle cellulaire. En effet, La surexpression de cette protéine dans la lignée aviaire LMH induit un blocage intra-S dans plus de 90% des cellules, blocage qui dépend de la localisation nucléaire de la protéine et de sa capacité à se lier aux histones. Nous avons également démontré que cette nouvelle activité de la protéine VP22 est conservée chez 2 autres espèces de Mardivirus et 2 alpha-herpesvirus humains, HSV-1 et VZV. Le mécanisme de blocage du cycle cellulaire en phase S associé à la VP22 sera discuté ainsi que le rôle potentiel de cette dérégulation du cycle cellulaire dans la lymphomagenèse.

### **Etude des micro ARN viraux circulants et de leurs transporteurs dans les carcinomes nasopharyngés. *François-Régis Ferrand – Claire Gourzones – Maryse Guérin - Pierre Busson.* (UMR 8126 et Département de Chirurgie cervico-faciale, Institut de Cancérologie Gustave Roussy)**

Les carcinomes nasopharyngés (NPC) sont des tumeurs malignes épithéliales humaines associées constamment au virus d'Epstein-Barr (EBV). Notre objectif consiste à déterminer si les miR-BART - microARN d'EBV abondamment produits par les cellules malignes - sont détectables dans le plasma des sujets porteurs de NPC et ont un intérêt pour la prise en charge clinique.

Nous avons extrait les ARN plasmatiques totaux provenant d'une série prospective de 27 patients NPC et de 10 témoins. Nous avons quantifié par RT-PCR en temps réel miR-BART17 et parallèlement 2 microARN cellulaires circulant servant de contrôles pour la qualité des ARN plasmatiques. Nous avons de plus étudié la distribution de ces microARN dans différentes fractions plasmatiques séparées par gradient de densité.

Nos résultats indiquent que : 1) EBV-miR-Bart-17 est détecté avec une concentration significativement plus élevée dans les échantillons de plasma des patients porteurs de NPC comparés à ceux des donneurs témoins ( $p = 9,69 \cdot 10^{-6}$  par test de Wilcoxon) ; 2) Les concentrations plasmatiques de miR-BART-17 sont indépendantes de la charge en ADN viral plasmatique et de l'extension tumorale (TNM) ; 3) miR-BART-17 présente une distribution plasmatique non-exosomale distincte de celle des miR cellulaires de référence.

Nous souhaitons poursuivre l'étude pour déterminer si mirBART-17 est détectable chez les sujets porteurs de NPC de petites tailles.