

UNIVERSITE PARIS XI, FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD

THESE DE DOCTORAT

Pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Spécialité : Cancérologie

**Libération extra-cellulaire de microARN et de complexes nucléo-protéiques par les cellules malignes infectées par EBV: rôle des exosomes et d'autres transporteurs.**

**CLAIRE GOURZONES**

**Directeur de thèse : Dr. Pierre BUSSON**

**Membres du Jury :**

**Président : Pr. Eric Deutsch**

**Directeur de thèse : Dr. Pierre Busson**

**Rapporteur : Dr. Corinne Amiel**

**Rapporteur : Dr. Henri Gruffat**

**Examineur : Pr. Joël Guigay**

**Examineur : Dr. Françoise Dantzer**

A mes parents, qui m'ont toujours soutenue. Vous avez été là à chaque fois que j'ai eu besoin de vous. Vous m'avez appris le courage et sans vous je ne serais rien. Vous êtes des parents formidables !

A mon mari Petr. Je ne pourrais jamais assez te remercier, je n'aurais jamais pu achever cette thèse sans toi. Merci d'avoir toujours su trouver les mots pour me redonner du courage quand je commençais à en manquer et avoir su me faire rire dans les moments difficiles. Tu es la plus belle rencontre de ces années de thèse ! Большое спасибо, я люблю тебя !

A ma sœur Célia, la personne la plus extraordinaire et la plus brillante que je connaisse.

A toute ma famille, mes grand-parents et Martine pour leur soutien permanent depuis toujours.

A mes amis d'enfance, la famille Lecoq et Gwendoline.

# Remerciements

Un grand merci au Docteur Pierre Busson qui m'a accueillie dans son équipe, formée et soutenue pendant toutes les étapes de cette thèse et de l'année de master qui l'a précédée. Je crois que peu de directeurs de thèse sont aussi disponibles pour leurs étudiants. Merci pour ta gentillesse et ta patience. Merci de m'avoir toujours aidée à surmonter les moments difficiles et d'avoir toujours su trouver des solutions aux problèmes techniques que j'ai pu rencontrer au cours de cette thèse. Merci de m'avoir fait travailler sur des sujets innovants et vraiment passionnants, j'ai, grâce à toi, énormément appris durant ces années de thèse. Merci beaucoup d'avoir participé à la rédaction de ce mémoire et de l'avoir corrigé.

Je remercie beaucoup Joëlle Wiels et Marc Lipinski de m'avoir accueillie dans leur unité et soutenue au cours de ma thèse.

Je remercie le Professeur Eric Deutsch pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider le jury de thèse.

Je remercie le Docteur Corinne Amiel et le Professeur Joël Guigay d'avoir activement participé à l'étude sur les microARN ainsi que Françoise Dantzer qui a partagé avec nous son expertise sur l'enzyme PARP1.

Je remercie beaucoup Henri Gruffat et Corinne Amiel d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse ainsi que le Professeur Joël Guigay et le Docteur Françoise Dantzer d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je remercie Catherine Durieu de m'avoir très bien formée et conseillée lorsque je suis arrivée dans l'équipe. Merci beaucoup pour ta patience!

Je tiens vraiment à remercier Aurore Gelin qui a apporté dans notre équipe une gentillesse, une chaleur et une bonne humeur extraordinaire. Merci beaucoup d'avoir travaillé avec moi : sans ton aide, mon travail n'aurait jamais pu aboutir.

Merci beaucoup Anne-Sophie pour ta gentillesse et ton soutien! Ton aide a été particulièrement précieuse pour toutes les expériences *in vivo*.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de l'UMR8126 qui m'ont tous aidée : Clément, Izabela, Luc, Jihène, Mélanie, Benjamin, Ana, Sonia, Anaïs, Aude, les trois Emilie, Xénia, Chloë, Arman, Schouaïb, Manel, Charles-Henry et Andreï.

Un grand merci à Muriel Nicoletti pour m'avoir aidée durant les différentes étapes administratives nécessaires à la soutenance.

# Résumé

En pathologie tumorale, l'étude du micro-environnement tumoral doit prendre en compte différents modes de communication cellulaire : contacts directs entre membranes plasmiques, émission et réception de cytokines et enfin émission et internalisation d'objets biologiques plus complexes comme les microvésicules et les exosomes qui peuvent être assimilés à de véritables organites extra-cellulaires.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) participe à l'oncogenèse de plusieurs affections malignes humaines d'origine épithéliale (carcinomes nasopharyngés ou NPC) ou lymphocytaire (lymphomes post-transplantation). Dans ces tumeurs, les cellules malignes qui sont infectées de façon latente par EBV libèrent des exosomes et des microvésicules qui contiennent des protéines et des acides nucléiques d'origine virale. L'étude de ces éléments doit permettre de mieux comprendre les interactions hôte-tumeur et de mettre en évidence de nouveaux biomarqueurs utiles pour le diagnostic précoce et la surveillance de la maladie sous traitement.

Le premier objectif de ma thèse consistait à étudier la sécrétion par les cellules malignes d'une famille de microARN viraux appelés miR-BART et leur diffusion dans le sang périphérique chez les sujets porteurs de tumeurs associées à EBV. Pour la première fois j'ai mis en évidence une sécrétion d'exosomes porteurs de miR-BART par les cellules de NPC en culture *in vitro*. J'ai également montré que les miR-BART, particulièrement miR-BART7, sont détectables dans le plasma de sujets porteurs de NPC. Contrairement à ce qui se passe *in vitro*, les miR-BART plasmatiques ne sont pas transportés par des exosomes. Des données obtenues chez la souris montrent qu'ils peuvent être transportés par des complexes extra-cellulaires que l'on peut précipiter au moyen d'anticorps anti-ago2. Nous cherchons à confirmer ces données sur des échantillons de plasma provenant de patients porteurs de NPC. Ces données pourront guider à l'avenir l'utilisation des miR-BART circulants comme source de biomarqueurs.

Le deuxième volet de ma thèse avait pour but d'étudier les modifications du protéome des exosomes induites par une oncoprotéine du virus d'Epstein-Barr appelée LMP1 (latent membrane protein 1). J'ai montré que la LMP1, lorsqu'elle est exprimée dans les cellules lymphocytaires ou épithéliales, infectées ou non par EBV, induit la libération de la protéine PARP1 dans le milieu extra-cellulaire. Cette PARP1 extra-cellulaire n'est pas associée aux exosomes ni aux

microvésicules mais à des nano-objets non-vésiculaires contenant notamment des histones et de l'ADN. Nous avons désigné ces objets sous le terme de complexes ADN-protéines extra-cellulaires. Nous ne savons presque rien de la biogenèse de ces complexes ; nous pensons qu'ils ne proviennent pas uniquement de cellules en apoptose. En revanche, des expériences préliminaires suggèrent que la présence de PARP1 dans ces complexes coïncide avec une activation permanente de la PARP1 induite dans les cellules productrices par l'expression de l'oncoprotéine LMP1. Cette hypothèse est en cours de vérification grâce à des expériences menées sur des lignées cellulaires exprimant différentes formes sauvages ou mutées de la LMP1. Ces données sur l'activation de la PARP1 et sur sa sécrétion induite par la LMP1 auront des retombées intéressantes pour notre compréhension des mécanismes d'oncogenèse et d'auto-immunité liés à l'infection par le virus d'Epstein-Barr.

# Liste des abréviations

- **Ago2:** protein Argonaute 2
- **ARNm :** ARN messenger
- **BARF1:** BamH1-A rightward frame 1
- **BART:** BamHI rightward transcripts
- **BCR:** B-cell receptor
- **BER:** Base Excision Repair
- **BHRF:** BamHI rightward open reading frame 1
- **BIC:** B-cell receptor inducible gene
- **BRCA1:** Breast cancer 1
- **CENP:** Centromere Protein
- **CCL20 :** C-C motif chemokine 20
- **Cellules NK:** cellules “Natural Killers”
- **CMH:** Complexe Majeur d’Histocompatibilité
- **Dcp :** mRNA Decapping enzyme
- **DGCR8 :** DiGeorge syndrome Critical Region 8
- **EBER :** Epstein-Barr virus Encoded RNA
- **EBNA :** Epstein-Barr Nuclear Antitigen
- **EBV :** Epstein-Barr Virus
- **EGF :** Epidermal Growth Factor
- **EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor
- **ELISA :** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
- **ERM :** Ezrine Radixine Moesine
- **ESCRT :** Endosomal Sorting Complex Required for Transport
- **Exp5 :** Exportine 5
- **FasL:** Fas ligand
- **GW182 :** Glycine-tryptophan protein of 182 kDa
- **HES 1 :** Hairy and Enhancer of Split 1
- **HLA:** Human leukocyte antigen
- **HMGA2:** High Mobility Group A2
- **Hrs:** Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate
- **Hsp90:** Heat shock protein
- **HTLV :** Human T Leukemia Virus
- **IFN:** Interféron

- **IL-8 : Interleukine 8**
- **ILV: vésicules intra-luminales**
- **IR : Internal Repeat**
- **IRAK1: Interleukin 1 Receptor-Associated Kinase 1**
- **IRES : Internal Ribosomal Entry Site**
- **KSHV: Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus**
- **LANA: Latency-Associated Nuclear Antigen**
- **LCL : Lignées Lymphoblastoïdes**
- **LMP1 : Latent Membrane Protein 1**
- **MFGE8 : Milk Fat Globule-EGF factor 8**
- **MNI: Mononucléose Infectieuse**
- **MVB: MultiVesicular Bodies**
- **NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide**
- **NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells**
- **NF-κB: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells**
- **NLS: Nuclear Localization Signal**
- **NMNAT-1: Nicotinamide Mononucleotide Adenyltransferase-1**
- **NPC : Naso-Pharyngeal Carcinoma**
- **OMS: Organisation Mondiale de la Santé**
- **ORC: Origine Recognition Complex**
- **PAPB: PolyA binding protein**
- **PARG: Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase**
- **PARP1 : poly(ADP-ribose) Polymerase 1**
- **PDC4: Programmed Cell death 4**
- **PIWI : P-element-Induced Wimpy Testis**
- **Pmel-17: molécule pré-mélanosomale 17**
- **PTLD : Post-transplant Lymphoproliferative Disorder**
- **PUMA: P53 Up-regulated Modulator of Apoptosis**
- **Ras : Rat Sarcoma**
- **RISC : miRNA-Induced Silencing Complex**
- **SCID: Severe Combined Immunodeficiency**
- **SNP : Single Nucleotide Polymorphism**
- **Sp1 : Specificity protein 1**
- **SSBR: Single-Strand Break Repair**
- **STAT1:Signal Transducer and Activator of Transcription**
- **TGF: Transforming Growth Factor**
- **TIM-3: T cell Immunoglobulin-and Mucin-domain-containing molecules-3**
- **TNF : Tumor Necrosis Factor**
- **TNFR1 : TNF Receptor-1**
- **TNRC6 : Trinucleotide Repeat Containing Gene 6**
- **TR : Terminal Repeat**

- **TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1 Associated Death Domain**
- **TRAF: TNF-associated factor**
- **TRAF6: TNF receptor associated factor 6**
- **TRAIL : Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand**
- **TxRE: Tax Responsive Element**
- **VCA: Viral Capsid Antigen**
- **VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine**
- **XRN1:5'-3' exoribonuclease1**
- **ZEBRA : Z Epstein-Barr virus Replication Activator**

# Sommaire

Remerciements .....	2
Résumé .....	4
Liste des abréviations .....	6
Sommaire .....	9
Préambule : .....	13
Première partie : Introduction bibliographique .....	15
1) Généralités sur le virus Epstein-Barr .....	16
1.1 Découverte du virus et entrée dans l'organisme. ....	16
1.2 Persistance dans l'organisme. ....	17
1.3 Expression du génome viral et profil des différentes formes de latence (voir figure 1 et 2). ....	18
1.4 EBV et cancers humains : liens de causalité ? .....	21
1.5 Rôle des protéines virales, immortalisation et transformation cellulaire.....	23
2) Généralités sur les NPC .....	26
2.1 Définition et classification. ....	26
2.2 Epidémiologie. ....	26
2.2a. Distribution géographique et ethnique.....	26
2.2b. Répartition en fonction de l'âge et du sexe : .....	27
2.3 Etiologie des NPC.....	27
2.3a. Facteurs génétiques. ....	28
2.3b. Facteurs environnementaux. ....	28
2.3c. Facteurs viraux-Infection par EBV.....	29
2.4 Outils biologiques pour l'établissement du diagnostic et du pronostic.....	29

2.4a. Outils pour le diagnostic positif.....	29
2.4b Outils pour le dépistage précoce.....	30
2.4c Outils pour le pronostic et la surveillance de l'évolution sous traitement .....	32
3) Généralités sur les microARN d'EBV .....	33
3.1 Généralités sur les micro-ARN : .....	33
3.1.a Découverte : .....	33
3.1.b. Biogénèse .....	34
3.1.c. Mécanismes d'inhibition de l'expression des protéines par les microARN.....	39
3.1.d : Nomenclature : .....	41
3.1.e : Fonctions biologiques connues et implication des microARN dans les cancers : oncomirs et miRs suppresseurs de tumeurs : .....	41
3.2. Dérégulation de l'expression de miRNA cellulaires par EBV .....	42
3.3. Les microARN du virus Epstein-Barr.....	43
3.3.a. Découverte : .....	43
3.3. b Expression dans les tumeurs et lignées cellulaires infectées par EBV .....	44
3.3.c Cibles et fonctions ( <b>Table1</b> ) .....	45
3.3.d. Fonctions oncogéniques : altération de gènes cellulaires. ....	46
3.3.e Régulation de l'expression virale.....	47
4) Introduction à la biologie des exosomes.....	49
4.1 Structure, biogenèse et composition biochimique des exosomes :.....	49
4.1.a Place des exosomes parmi l'ensemble des vésicules libérées par différents types de cellules eucaryotes ( voir <b>table 2</b> ): .....	49
4.1.b Formation des exosomes : .....	52
4.1.c Composition protéique des exosomes : (Simpson, Jensen et al. 2008) (Raposo, Nijman et al. 1996).....	54
4.1.d Mécanismes de l'incorporation sélective de protéines dans les exosomes : .....	55
4.1.e Composition des exosomes en acides nucléiques : .....	56
4.1.f Composition lipidique des exosomes :.....	56
4.2. Fonctions des exosomes :.....	57
4.2.a Introduction.....	57
4.2.b Présentations d'antigènes :.....	57
4.2.c Modulation de la réponse immunitaire :.....	58

4.2.d Transfert de virus et prions .....	58
4.2.e Transfert d'ARNm et de microARN :.....	59
4.2.f Action oncogénique :.....	62
4.3. Interêt de l'étude des exosomes pour la recherche de marqueurs biologiques : .....	62
5) Généralités sur la PARP-1 .....	64
5.1 Structure.....	64
5.2 Fonctions .....	65
5.2.a : Rôles de la PARP1 dans la réparation de l'ADN :.....	66
5.2.b : PARP1 et stabilité des centromères :.....	67
5.2.c : PARP1 et contrôle de la transcription :.....	67
5.2.d : Rôle de la PARP1 dans l'apoptose :.....	68
5.2.e : Rôle dans l'oncogenèse :.....	68
5.2.f : Rôle de PARP1 dans le cycle viral de différents virus :.....	69
Deuxième partie : Résultats .....	71
1) Premier manuscrit publié : .....	72
<b>Libération extra-cellulaire de micro-ARN viraux : rôles des exosomes et autres transporteurs.....</b>	<b>72</b>
1.1. Introduction à la problématique de l'article : .....	74
2) Deuxième manuscrit (en préparation) : .....	77
<b>Detection of Epstein-Barr virus microRNAs in plasma samples from NPC patients: enhanced detection by Ago2 immunoprecipitation. ....</b>	<b>77</b>
2.1 Introduction.....	77
2.2 Matériel et méthodes.....	79
2.3 Résultats .....	81
2.4 Discussion .....	95
3) Troisième manuscrit (en préparation) : .....	97
<b>L'oncoprotéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr induit une activation permanente de la PARP1 dans les cellules lymphoïdes et épithéliales .....</b>	<b>97</b>
3.1 Introduction.....	97

3.2 Matériel et méthodes :.....	98
3.3 Résultats .....	101
3.4. Discussion .....	108
Discussion Générale .....	109
Bibliographie.....	115
ANNEXES.....	127

# Préambule :

Les travaux exposés dans ce mémoire de thèse se situent à la rencontre de deux thématiques. D'une part, l'étude de divers types de vésicules et autres objets biologiques secrétés par les cellules eucaryotes et en particulier les exosomes : des nanovésicules libérées dans le milieu extra-cellulaire. D'autre part, l'étude des tumeurs humaines associées au virus d'Epstein-Barr (EBV) notamment les carcinomes nasopharyngés.

Dans ce préambule, je vais expliquer brièvement pourquoi ces deux thématiques nous apparaissent comme complémentaires puis présenter le plan de ce mémoire.

Les carcinomes naso-pharyngés (NPC) sont les tumeurs humaines associées au virus d'Epstein-Barr les plus fréquentes au niveau mondial. Leur incidence est particulièrement élevée dans certaines régions du monde (Chine, Afrique du Nord) où ils constituent un grave problème de santé publique mais aussi en Europe où ils deviennent plus fréquents en raison de l'immigration en provenance des régions de forte endémie. La mortalité reste élevée, souvent voisine de 50% du fait de la fréquence des métastases ganglionnaires et viscérales. Même en cas de guérison, les séquelles de la radiothérapie sont souvent invalidantes. Fait remarquable, la réponse immunitaire contre les cellules de NPC est inefficace bien qu'un infiltrat inflammatoire abondant soit retrouvé au sein de la tumeur et que les cellules tumorales expriment des antigènes viraux.

Mon équipe d'accueil s'intéresse depuis longtemps aux interactions cellulaires dans les NPC, cherchant à élucider les mécanismes d'échappement immunitaire et à mettre en évidence des mécanismes de croissance autocrines ou paracrines. C'est dans ce cadre que des membres de l'équipe ont décrit l'activité immunosuppressive des exosomes produits par les cellules malignes de NPC ou par les lymphocytes B transformés *in vitro* par EBV. Tandis que ces travaux étaient en cours, d'autres équipes ont rapporté des transferts horizontaux inter-cellulaires d'ARN transportés par les exosomes. Ces observations soulignaient encore l'importance des exosomes dans les communications cellulaires et probablement dans les interactions hôte-tumeur. Au même moment, l'équipe réalisait à quel point les NPC constituaient un bon modèle pour l'étude des exosomes tumoraux. En effet, les exosomes de NPC ou de cellules transformées par EBV sont susceptibles de contenir des éléments viraux spécifiques des cellules tumorales - protéines ou ARN - qui permettent de les détecter et de suivre leur dissémination.

Mon premier objectif consistait à déterminer si les exosomes tumoraux de NPC pouvaient transporter des microARN d'EBV et éventuellement les faire pénétrer et agir dans des cellules receveuses distinctes des cellules productrices. Je me suis écartée progressivement de cet objectif pour différentes raisons, en particulier en constatant que les microARN d'EBV circulants n'étaient pas véhiculés par des exosomes. En revanche, j'ai obtenu des données essentielles pour préparer l'utilisation des microARN d'EBV circulants comme source de biomarqueurs chez les malades porteurs de NPC. Ces résultats font l'objet d'un article déjà publié et d'un manuscrit en préparation (sections 1 et 2 de la partie résultats).

Mon second objectif consistait à étudier l'influence de l'oncoprotéine LMP1 d'EBV sur la composition protéique des exosomes. D'une manière imprévue, cette étude m'a conduit à caractériser des éléments sécrétés distincts des exosomes que nous avons appelés complexes ADN-protéines. L'expression de la LMP1 a pour effet d'induire une sécrétion de l'enzyme PARP1 que l'on retrouve dans le milieu extra-cellulaire associée à ces complexes ADN-protéines. Cette sécrétion de PARP1 induite par la LMP1 s'accompagne de plus d'une augmentation de la quantité de poly(ADP-ribose) cellulaire. Ce travail, qui est toujours en progression dans l'équipe actuellement, fait l'objet de la troisième section dans la partie résultats.

L'introduction bibliographique qui précède l'exposé des résultats comprend 5 chapitres. Le premier chapitre présente l'essentiel des données sur la biologie du virus Epstein-Barr ; en particulier les modes de persistance du virus dans l'organisme associés à différentes modalités d'expression du génome viral. Je me suis attardée plus particulièrement sur le rôle de l'infection virale dans le développement de cancers. Dans le deuxième chapitre, j'ai exposé quelques données importantes sur l'épidémiologie particulière des NPC et leur étiologie ainsi que sur le rôle que joue EBV dans le développement de ces tumeurs. Dans un autre chapitre, j'ai rassemblé quelques données sur les microARN (biogenèse, fonctions) en insistant surtout sur le rôle des microARN d'EBV dans le cycle viral et l'oncogenèse. J'ai ensuite voulu expliquer pourquoi l'étude des exosomes est particulièrement intéressante dans le contexte des NPC. Enfin, j'ai rapidement exposé quelques données sur la protéine PARP1.

# **Première partie : Introduction bibliographique**

# 1) Généralités sur le virus Epstein-Barr

## 1.1 Découverte du virus et entrée dans l'organisme.

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus (famille des Herpesviridae, sous-famille des  $\gamma$ -Herpesvirinae, genre des Lymphocryptovirus) découvert en 1964 par Anthony Epstein, Bert Achong et Yvonne Barr à partir de l'identification de particules virales dans des cellules de lymphomes de Burkitt cultivées *in vitro* et observées en microscopie électronique (Epstein, Achong *et al.* 1964). Le génome de ce virus fut ensuite détecté dans des biopsies de tumeurs par hybridation *in situ* (zur Hausen, Schulte-Holthausen *et al.* 1970).

On estime que 90% à 95% de la population mondiale est infectée par le virus Epstein-Barr. Comme pour tous les Herpesviridae, tout sujet infecté reste porteur la vie durant, le plus souvent sans manifestations pathologiques tardives. On parle d'infection persistante asymptomatique chez un porteur sain.

La primo-infection se produit généralement pendant l'enfance par transmission orale (salive) et passe alors inaperçue ou ne conduit qu'à des manifestations cliniques légères (Raab-Traub 2007). Bien que les modes de contamination ne soient pas connus précisément, le léchage d'objets et leur partage entre enfants ou les contacts salivaires entre parents et enfants sont probablement les circonstances qui conduisent à la transmission du virus. Dans les pays ayant un haut niveau d'hygiène, la primo-infection survient presque uniquement chez l'adolescent et le jeune adulte et peut alors se traduire dans 30 à 50% des cas par une mononucléose infectieuse (MNI) (Luzuriaga and Sullivan 2010). Après un épisode infectieux aigu marqué par une forte fièvre et une période de fatigue de plusieurs semaines accompagnée d'un taux élevé de particules virales libérées dans la salive, la MNI fait place à l'état de porteur sain. Cependant, les sujets ayant des antécédents de MNI ont un risque accru de maladie de Hodgkin associée à EBV par rapport à ceux qui ont fait une primo-infection silencieuse. Cette augmentation de risque est discrète mais statistiquement significative (Hjalgrim, Askling *et al.* 2003; Al Tabaa, Tuailon *et al.* 2009).

Le virus Epstein-Barr infecte préférentiellement les lymphocytes. La glycoprotéine gp350 présente sur l'enveloppe virale se lie au CD21, récepteur des fractions C3d et C3g du complément, présent à

la surface des lymphocytes B. Ce récepteur est aussi retrouvé sur les cellules T et dans une moindre mesure sur les cellules épithéliales. La glycoprotéine gp42 s'associe aux molécules HLA de classe II qui servent alors de co-récepteur et permettent la fusion de la membrane virale avec la membrane cellulaire puis la pénétration du virus dans les cellules. L'infection des cellules épithéliales par le virus est possible mais moins efficace que pour les lymphocytes B (Young and Rickinson 2004).

La porte d'entrée du virus dans l'organisme pourrait être d'une part les cellules épithéliales de l'oropharynx, du nasopharynx postérieur et de la glande parotide et d'autre part certaines sous-populations lymphocytaires des amygdales (Miller, Niederman *et al.* 1973; Sixbey, Nedrud *et al.* 1984; Wolf, Haus *et al.* 1984; Raab-Traub 2007).

## 1.2 Persistance dans l'organisme.

La persistance d'EBV dans l'organisme après la primo-infection s'explique par deux grands mécanismes d'interaction entre le virus et les cellules. Premièrement, différentes modalités d'**infection latente** sont possibles dans les lymphocytes B. L'infection latente se traduit par la persistance du génome viral dans les cellules et l'expression d'une ou de quelques protéines de latence. Les lymphocytes B infectés de façon latente ne produisent pas de particules virales. Ils sont plus ou moins « furtifs » vis-à-vis du système immunitaire en fonction du programme de latence mis en œuvre (voir ci-dessous) et ils sont souvent proliférants. L'autre grand mécanisme d'interaction virus-cellule est l'**infection lytique et productive**. Elle aboutit à la libération de particules virales dans le milieu extra-cellulaire et s'accompagne *ipso facto* de la mort de la cellule infectée. Elle favorise la dissémination du virus de cellule à cellule et d'organisme à organisme.

A la suite de la primo-infection, le système immunitaire élimine rapidement les cellules en cycle lytique mais ne peut se débarrasser totalement de certaines cellules B au sein desquelles le virus met en œuvre un programme de latence s'accompagnant d'une expression minimale des gènes viraux notamment dans les lymphocytes B mémoires IgD- et CD27+. Les mécanismes du passage de l'infection lytique à l'infection latente sont en partie élucidés ; EBV a une capacité remarquable à induire dans les lymphocytes B des changements de phénotype parallèles aux processus normaux de différenciation des lymphocytes dans les follicules germinatifs. Ce passage « frauduleux » du phénotype de lymphocyte B vierge à celui de lymphocyte B mémoire est favorisé par l'expression des protéines LMP1 et LMP2 (Babcock, Decker *et al.* 1998; Roughan and Thorley-Lawson 2009;

Roughan, Torngbor et al. 2010). Chez un porteur sain, 1 à 100 lymphocytes sur 1 million sont infectés (Young and Rickinson 2004).

La réponse immunitaire contre les cellules infectées de façon latente est alors limitée ou nulle. En cas d'infection latente, le génome viral se circularise et persiste dans la cellule sous forme épisomale. La réplication du génome viral s'effectue de façon synchrone par rapport au génome cellulaire grâce à la protéine virale EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) qui s'associe à l'oriP : origine de réplication du virus et au génome cellulaire (Sears, Ujihara *et al.* 2004; Nayyar, Shire et al. 2009).

Dans certaines circonstances, un cycle lytique peut être induit avec production de nouvelles particules virales qui peuvent alors infecter de nouvelles cellules ou être libérées à l'extérieur de l'organisme. On parle de réactivations virales périodiques. Les protéines virales dites immédiates-précoces BZLF1 (aussi appelée EB1) et BRLF1, jouent un rôle clé dans le déclenchement de la réactivation virale (Chevallier-Greco, Manet *et al.* 1986; Chevallier-Greco, Gruffat *et al.* 1989; Manet, Gruffat *et al.* 1989; Feederle, Kost *et al.* 2000).

### 1.3 Expression du génome viral et profil des différentes formes de latence (voir figure 1 et 2).

Le génome viral présent dans les particules virales est une molécule linéaire d'ADN double brin de 185kb constituée de régions uniques et de régions répétées. Ces séquences répétées sont présentes dans les régions terminales (TR) ou internes (IR1 à IR4) du génome d'EBV. Le nombre de séquences TR de 500 pb est variable. Après pénétration dans les cellules et au cours du cycle lytique, le génome viral est répliqué par une ADN polymérase virale. En revanche, dans les cellules infectées de façon latente, le génome se circularise (épisomes) grâce aux régions TR (Raab-Traub 2007) (**figure 1**). Ces épisomes extra-chromosomiques sont alors répliqués en même temps que le génome cellulaire par une ADN polymérase cellulaire (Raab-Traub and Flynn 1986).

*In vitro*, l'infection par EBV de lymphocytes B provenant d'un donneur sain aboutit à la naissance de lignées transformées capables de proliférer indéfiniment et de donner des tumeurs chez la souris SCID. On les désigne sous le nom de **lignées lymphoblastoïdes (LCL ou lymphoblastoid cell lines)**. La transformation de ces lignées par EBV est un processus extrêmement fort qui s'effectue en une étape. Si les lymphocytes proviennent d'un donneur EBV-négatif (par exemple s'il s'agit de

lymphocytes du sang de cordon), la transformation des lymphocytes B *in vitro* n'est pas inhibée par les lymphocytes T du donneur. Dans le cas d'un donneur sain EBV-positif, l'obtention de LCL est favorisée par l'addition d'un agent immunosuppresseur comme la cyclosporine qui bloque l'activation des lymphocytes T du donneur.

Les LCL représentent le modèle principal d'infection et de transformation par EBV *in vitro*.

Dans ces cellules lymphoblastoïdes, des protéines de latence sont exprimées (**figure 2**) : tout d'abord six protéines EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1, 2, 3A, 3B, 3C et LP) ainsi que 3 protéines membranaires : LMP1, -2A, -2B (Latent Membran Protein) (Young and Rickinson 2004).

On note aussi dans les LCL la présence d'ARN viraux non traduits, notamment des ARN de petite taille, non polyadénylés et non codants les EBER1 et EBER2 et des microARN viraux (voir partie 3 de l'introduction). Ce profil d'expression correspond à la **latence de type III** qui est observée dans les lignées LCL. Ce type de latence est aussi observé dans des lymphocytes tumoraux de patients atteints de lymphomes post-tranplantation (PTLD) ou associés à l'infection par le VIH lorsque le système immunitaire est incapable de contrôler l'infection par EBV. Dans les cellules en latence III, on note l'expression des marqueurs d'activation des lymphocytes B qui est élevée lorsque les lymphocytes sont stimulés par des signaux mitogéniques ou antigéniques. L'infection par EBV mime donc les modifications phénotypiques observées lors de la stimulation physiologique de la prolifération des lymphocytes B (Young 2005).

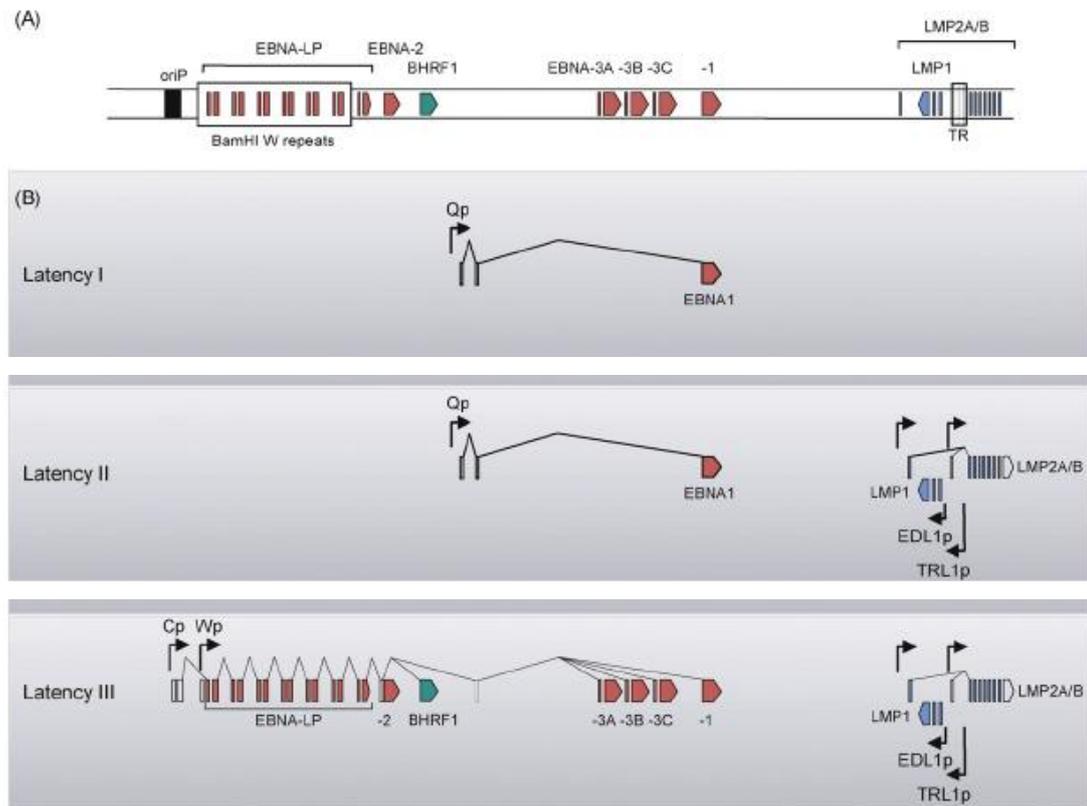
D'autres profils d'expression sont observés dans d'autres types de lignées cellulaires infectées de façon latente :

-la **latence I** observée dans des lignées issues de lymphomes de Burkitt : seule la protéine EBNA1 est exprimée ainsi que les transcrits non traduits EBER et les microARN BHRF1.

-la **latence II** que l'on retrouve dans les cellules de carcinomes naso-pharyngés (NPC) et les lymphomes de Hodgkin associés à EBV. Il y a expression des protéines EBNA1, LMP1, LMP2A et B et des EBER ainsi que la protéine BARF1 et des microARN produits à partir des transcrits BART.

-la **latence 0** observée *in vivo* dans les lymphocytes B mémoires où seules la LMP2A et EBNA1 peuvent être retrouvées (Babcock, Decker *et al.* 1998) .





**Figure 2 : Profils d'expression des protéines d'EBV dans les différentes formes de latence.**

**Figure 2A :** schéma du génome d'EBV représentant les exons codants pour les protéines EBNA 1, 2, 3A, 3B et 3C, BHRF1 et les protéines membranaires LMP1, LMP2A et LMP2B ainsi que l'origine de répliation OriP , les répétitions internes Bam HIW et les répétitions terminales TR.

**Figure 2B :** Expression des produits viraux au cours des différents types de latences : Les promoteurs sont identifiés par des flèches noires. Dans les cellules en latence I, l'expression se limite à la protéine EBNA1 exprimée à partir du promoteur Qp. Dans les cellules en latence II, on note en plus l'expression des protéines membranaires LMP à partir de promoteurs séparés présents dans les régions Bam HI N du génome d'EBV. Lors de la latence III, toutes les protéines latentes sont exprimées : les EBNAs à partir de l'épissage alternatif d'un transcrit produit à partir des promoteurs Cp ou Wp présents dans les régions BamHI C et W ; le promoteur Wp permet aussi l'expression de BHRF1 (Rowe, Kelly *et al.* 2009) (Young 2005).

## 1.4 EBV et cancers humains : liens de causalité ?

Dans les années 1960 un médecin, Denis Burkitt, étudiait une tumeur particulière : le lymphome de Burkitt qui affectait les jeunes enfants. Les zones de forte endémie en Afrique équatoriale coïncidaient avec des régions humides et chaudes. Cette distribution particulière se superposant

avec des zones d'endémie de paludisme suggérait le rôle éventuel d'un pathogène dans ces cancers, peut-être transmis par des moustiques. Effectivement, un herpèsvirus (qui sera ensuite appelé EBV) fut découvert dans des échantillons de lymphomes de Burkitt par Epstein, Achong et Barr en 1964 (Epstein, Achong *et al.* 1964; Rowe, Kelly *et al.* 2009). Une association entre l'infection par ce virus et le développement des lymphomes de Burkitt fut alors évoquée. Cependant, ce virus a ensuite été détecté chez l'immense majorité des sujets testés quelque soit leur origine géographique ; son rôle dans la survenue de tumeurs globalement rares au sein de la population mondiale et géographiquement localisées était alors difficilement explicable.

Quelques années plus tard, le rôle pathogène d'EBV dans les mononucléoses infectieuses a été découvert. A partir de 1966, des études séro-épidémiologiques ont ajouté un argument en faveur du rôle oncogène du virus : chez les patients atteints de lymphomes de Burkitt, des titres plus élevés en anticorps contre les antigènes d'EBV ont été détectés (Henle and Henle 1966; Old, Boyse *et al.* 1966; Henle, Henle *et al.* 1970). De plus, une augmentation du titre des anticorps anti-VCA (Viral Capsid Antigen ou antigène de capsid) semblait précéder de plusieurs années le développement des lymphomes de Burkitt (de-The, Geser *et al.* 1978) . En 1973 et 1978, ce virus fut isolé à partir d'échantillons de NPC (Wolf, zur Hausen *et al.* 1973; Huang, Ho *et al.* 1978) et la capacité du virus à induire des tumeurs chez les primates non humains fut découverte (Miller 1974). Les NPC sont associés à EBV dans 100% des cas et les EBER sont détectés dans l'immense majorité des cellules de NPC.

Un argument supplémentaire démontrant l'association de l'infection par EBV et le développement des NPC est la présence dans les cellules d'une même tumeur d'un nombre de répétitions TR identique démontrant la clonalité du génome viral dans ces cellules. Les cellules tumorales dérivent donc d'une même cellule infectée par EBV (Raab-Traub and Flynn 1986; Pathmanathan, Prasad *et al.* 1995).

D'autres tumeurs lymphocytaires sont associées à l'infection par ce virus : des lymphomes des cellules T, des tumeurs des glandes parotides (au sein des populations inuits), des lymphomes de Hodgkin mais aussi des tumeurs épithéliales comme certains carcinomes gastriques (Saemundsen, Albeck *et al.* 1982; Weiss, Movahed *et al.* 1989; Su, Lin *et al.* 1990; Shibata, Tokunaga *et al.* 1991; Hjalgrim, Askling *et al.* 2003; Young and Rickinson 2004). Dans le cas des lymphomes de Burkitt, EBV est présent dans tous les lymphomes endémiques, dans 85 % des lymphomes survenant dans

les zones d'incidence moyenne et dans 15 % des lymphomes dans les pays développés (Pathmanathan, Prasad *et al.* 1995; Horikawa, Yoshizaki *et al.* 2011).

Toutefois, la distribution de ce virus étant ubiquitaire au sein de la population mondiale, la survenue de cancers associés à l'infection par EBV nécessite donc forcément la présence de co-facteurs.

### 1.5 Rôle des protéines virales, immortalisation et transformation cellulaire.

*In vitro*, la capacité du virus EBV à immortaliser et transformer les cellules a rapidement été démontrée. Ainsi, lorsque des cellules B primaires provenant de donneurs non infectés par EBV sont exposées à des lymphoblastes irradiés provenant de lignées productrices de virus ou à du virus concentré, des lignées de lymphoblastes immortalisés EBV+ sont obtenues. En revanche, des cellules B primaires non exposées ne survivent pas (Henle and Henle 1973). L'infection des cellules par EBV modifie leur aspect (Henle and Henle 1973).

Ces modifications cellulaires s'expliquent par l'expression simultanée d'un ensemble de produits viraux qui concourent à la transformation. EBNA2 et la LMP1 sont indispensables à la transformation des lymphocytes B (Young 2005). D'autres protéines virales de latence participent aussi à la transformation.

- La protéine **EBNA1** a, à elle seule, des propriétés transformantes : *in vivo* des cellules B exprimant cette protéine induisent des lymphomes B chez des souris transgéniques et EBNA1 joue un rôle dans la survie des lymphocytes issus de lymphomes de Burkitt en préservant ces cellules de l'apoptose (Wilson, Bell *et al.* 1996; Kennedy, Komano *et al.* 2003; Young and Rickinson 2004).
- La protéine **EBNA2** est nécessaire pour la transformation des lymphocytes B (Cohen, Wang *et al.* 1989; Hammerschmidt and Sugden 1989) , elle régule l'expression des protéines LMP1 et LMP2 dans les LCL.
- Les protéines **EBNA3** et **EBNA-LP** ont aussi un rôle dans la transformation (Tomkinson, Robertson *et al.* 1993; Tomkinson, Robertson *et al.* 1993; Robertson, Tomkinson *et al.* 1994; Robertson, Grossman *et al.* 1995; Parker, Crook *et al.* 1996; Parker, Touitou *et al.* 2000). Ainsi

EBNA3C joue un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire en coopérant avec RAS. EBNA3C et EBNA3A participent à la transformation en réprimant p6INK4A et p14ARF (Maruo, Zhao *et al.* 2011).

- La **LMP1** est la principale protéine oncogène d'EBV. Elle est nécessaire à la transformation des lymphocytes B (Kaye, Izumi *et al.* 1993). Comme d'autres protéines oncogéniques classiques, la LMP1 peut induire la transformation de lignées de cellules de rongeurs immortalisées, non transformées (Wang, Liebowitz *et al.* 1985). Cette protéine agit dans la cellule d'une façon comparable à certains récepteurs de type TNF-récepteur (tumor necrosis factor récepteur ou TNFR) constitutivement activés et interagit avec la protéine à domaine de mort TRADD (Tumor necrosis factor Receptor type 1 Associated Death Domain protein) et les protéines TRAF (TNFR-associated factors).

La LMP1 a des effets très intenses et pléiomorphes quelque soit le type cellulaire considéré. L'éventail de ces effets est dépendant du contexte cellulaire. La LMP1 peut activer de nombreuses voies de signalisation cellulaires et notamment les voies des facteurs NF- $\kappa$ B. Ces facteurs stimulent l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que A20 et Bcl2 et de cytokines (Mosialos, Birkenbach *et al.* 1995; Eliopoulos, Stack *et al.* 1997; Gires, Zimber-Strobl *et al.* 1997; Kilger, Kieser *et al.* 1998; Eliopoulos, Gallagher *et al.* 1999; Uchida, Yasui *et al.* 1999; Young 2005). D'un point de vue fonctionnel, la LMP1 mime en partie l'action du récepteur CD40 qui est indispensable à la croissance et à la différenciation des cellules B. De plus, l'expression de la LMP1 joue un rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules épithéliales notamment en induisant une augmentation de l'expression de Snail ou de la métalloprotéinase 9 (Horikawa, Yoshizaki *et al.* 2000; Horikawa, Yoshizaki *et al.* 2011).

- Les protéines membranaires **LMP2 A** et **B** produisent des effets généralement moins intenses que ceux de la LMP1 mais également très variés. On peut se référer à l'excellente revue de KT Bieging *et al.* (Bieging, Anderson *et al.* 2010). Les deux formes de LMP2 sont générées par épissage alternatif. La LMP2B est colinéaire de la LMP2A pour les 12 domaines transmembranaires mais il lui manque une partie N-terminale intra-cytoplasmique. Cette partie N-terminale qui n'appartient qu'à la LMP2A contient 8 résidus tyrosine qui sont constitutivement phosphorylés dans les lymphocytes B. Ces tyrosines phosphorylées recrutent des tyrosines kinases non-récepteurs qui sont des partenaires physiologiques du BCR (B-cell receptor) notamment lyn et syk. Il en résulte à la fois une inhibition de l'activation du BCR qui favorise le maintien de la latence virale et des

signaux positifs de survie et de prolifération des cellules B même en l'absence de stimulation antigénique ; signaux médiés au moins en partie par l'activation des voies PI3-kinase et akt . La LMP2 n'est pas strictement indispensable à la transformation de lymphocytes B *in vitro*. En revanche *in vivo* elle permet la survie de cellules B naïves qui n'expriment pas un BCR fonctionnel et qui seraient normalement éliminées par apoptose. Cette fonction qui a été mise en évidence dans des modèles de souris transgéniques est sans doute importante dans la pathogénie de la maladie de Hodgkin (Caldwell, Wilson *et al.* 1998; Young and Rickinson 2004). Dans les cellules épithéliales, la LMP2a active les voies de signalisation PI3-kinase, entraînant une activation d'akt et une translocation de la  $\beta$ -caténine dans le noyau. Elle active également la voie Erk. Les événements de signalisation en amont des voies PI3-kinase et Erk ont été relativement peu étudiés dans les cellules épithéliales. En revanche, dans plusieurs types de cellules épithéliales, la LMP2 stimule la migration cellulaire et augmente la tumorigénicité. A noter que la LMP2 peut être libérée dans le milieu extra-cellulaire en association avec des exosomes (Ikeda and Longnecker 2007).

- Les transcrits **EBER** (Epstein-Barr Encoded RNA) sont les transcrits les plus abondants dans les cellules infectées de façon latente. Ils s'associent aux protéines La et L22, se lient à la PKR ce qui confère à la cellule une résistance à l'apoptose induite par l'interféron. L'expression des EBER participe aussi à l'inhibition de l'apoptose en induisant l'augmentation de l'expression de bcl-2 (Ruf, Rhyne *et al.* 2000; Takada and Nanbo 2001; Nanbo, Inoue *et al.* 2002; Iwakiri and Takada 2010).
- **BARF1** (BamHI-A Rightward frame 1) codée par la région BamHI est exprimée dans les NPC et les carcinomes gastriques. BARF1 a des propriétés transformantes *in vitro* et *in vivo*. Elle peut transformer des cellules de rongeurs et des cellules épithéliales de singe. C'est une protéine membranaire qui peut être clivée. Alors que le fragment libéré a des propriétés oncogènes, la partie transmembranaire restante induit l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 favorisant la croissance tumorale et la survie cellulaire.
- **BHRF1** est un homologue viral de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Rowe, Kelly *et al.* 2009).

D'autres transcrits viraux non traduits sont présents dans les cellules et pourraient participer à l'oncogenèse virale, ils seront décrits dans la partie 3 de l'introduction.

## 2) Généralités sur les NPC

### 2.1 Définition et classification.

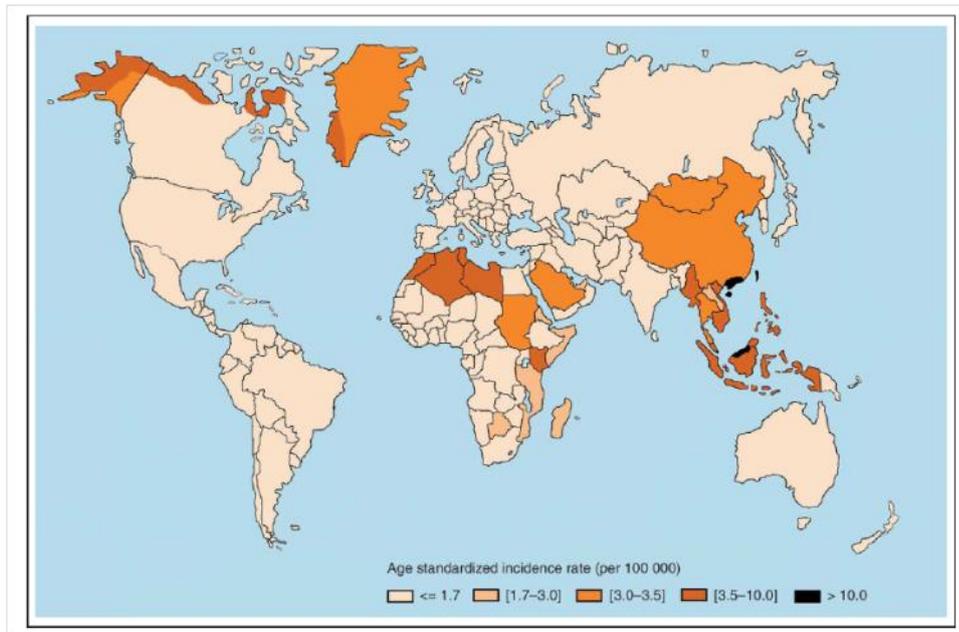
Les NPC sont des carcinomes se développant à partir de l'épithélium qui tapisse la cavité nasopharyngée en arrière des fosses nasales. Les premières descriptions datent de 1901 et 1922 à partir d'études sur des groupes de 14 et 79 patients respectivement. Mais les caractéristiques cliniques de cette tumeur ne furent définies qu'en 1941 à partir d'une étude sur 114 patients (Jackson 1901; New 1922; Digby, Fook et al. 1941; Wei and Sham 2005). Une des caractéristiques histologiques est l'infiltration de la tumeur par un grand nombre de cellules lymphoïdes. Les NPC sont classés en trois groupes par l'OMS en fonction de critères histologiques :

- les carcinomes épidermoïdes bien différenciés kératinisants (type I)
- les carcinomes épidermoïdes non kératinisants (type II)
- les carcinomes indifférenciés (type III) ou UCNT (undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type).

### 2.2 Epidémiologie.

#### *2.2a. Distribution géographique et ethnique*

En 2002, 80 000 nouveau cas de NPC ont été diagnostiqués et 50 000 sujets atteints en sont morts. Il s'agit du 23<sup>ème</sup> cancer le plus fréquent dans le monde (Chang and Adami 2006). Une des grandes particularités des NPC est leur répartition géographique très inégale. Cette tumeur est rare dans de nombreux pays où l'incidence par an est inférieure à 1/ 100 000 (Europe, Amérique du nord). Il existe néanmoins des zones de forte incidence (>20/100 000) où cette tumeur est endémique et représente un problème majeur de santé publique : c'est le cas en Chine du sud et dans le sud-est asiatique (surtout dans la région de Canton où l'incidence atteint 25/100 000 et à Honk-Kong où les NPC représentent la 4<sup>ème</sup> tumeur la plus fréquente). Entre les deux, il existe des zones d'incidence intermédiaire (3 à 8 /100 000) en Alaska, au sein des populations inuits du Groenland ainsi qu'en Afrique du nord et au Moyen Orient, au Kenya et au Soudan (voir **figure 3**) (Busson, Ooka *et al.* 2004).



(Busson, Ooka *et al.* 2004)

**Figure 3 : Distribution géographique des cas de NPC.**

Les NPC sont fréquents en Asie du sud-est, en Afrique du nord et parmi les populations esquimaudes. Dans les régions de fortes incidences, 95% des NPC sont de type III et 5% de type II, dans les régions de faible incidence environ la moitié des NPC sont de type I (Chang and Adami 2006).

### 2.2b. Répartition en fonction de l'âge et du sexe :

Les hommes sont en moyenne deux à trois fois plus atteints que les femmes, que ce soit dans les régions à forte ou faible incidence (Chang and Adami 2006) .

Le principal pic d'incidence en fonction de l'âge se situe autour de la cinquantaine. Il existe un second pic d'incidence autour de 10-20 ans. Cette forme juvénile des NPC s'observe surtout en Afrique du nord où elle représente 20% des patients (Khabir, Sellami *et al.* 2000; Chang and Adami 2006).

## 2.3 Etiologie des NPC

L'origine des NPC est multifactorielle et est le résultat de la combinaison de facteurs viraux (virus Epstein-Barr), environnementaux et génétiques.

Une origine génétique et environnementale est démontrée par l'existence de cas d'agrégation familiale et l'étude des populations affectées par cette tumeur. Ainsi, la plupart des cas de NPC survenant en Asie du Sud-est frappent principalement la population cantonaise que ce soit à Canton

même où l'incidence est la plus forte ou à Honk-Kong où l'incidence est particulièrement élevée au sein de populations d'origine Cantonaise. D'autre part, des études sur les migrations de Chinois aux Etats-Unis, de migrants originaires d'Afrique du nord en Europe ou d'inuits originaires du Groenland vers le Danemark ont montré que la forte incidence des NPC au sein de populations vivant en zones d'endémie était conservée bien que diminuant au cours des générations après migration de ces population dans des zones de faible incidence. La diminution de l'incidence des NPC au fil des générations est fonction de la durée de séjour en zone de faible incidence. Elle pourrait s'expliquer par un métissage et donc une diminution de l'impact de facteurs génétiques mais aussi par une perte progressive de coutumes ou un changement de régime alimentaire ainsi que par l'élévation du niveau de vie (Chang and Adami 2006).

### *2.3a. Facteurs génétiques.*

Le facteur familial est très marqué pour les NPC. Ainsi à Taïwan, le risque d'être atteint est 11 fois plus grand si il existe déjà un cas apparenté (parmi les parents, frères et sœurs, oncles et tantes ou cousins) (Yu, Hsu *et al.* 2011). La même observation a été faite dans la population inuit du Groenland (risque 8 fois plus grand) (Friborg, Wohlfahrt *et al.* 2005). On ne sait pas bien dans quelle mesure le risque pour d'autres cancers distincts du NPC est accru dans ces familles.

Certains allèles des molécules HLA de classe I sont aussi associés aux NPC : diverses études en Asie ont montré que les allèles HLA-A2, surtout l'allèle HLA-A\*0207, -B14, -B46 étaient positivement corrélés aux NPC. L'allèle HLA-A11 est négativement corrélé aux NPC. Des études d'association récentes à l'aide de puces de SNP pangénomiques ont confirmé le rôle essentiel de la région du complexe majeur d'histocompatibilité dans le déterminisme génétique des NPC (Bei, Li *et al.* 2010).

### *2.3b. Facteurs environnementaux.*

Différents facteurs environnementaux ont été évoqués tels que l'inhalation de certains toxiques dans le cadre professionnel ou la fumée de cigarette mais le seul facteur dont le rôle dans les NPC ait été démontré est un mode particulier de conservation des poissons par salage : ce procédé fréquent en Asie du sud-est conduit à la libération de nitrosamines, de substance cancérigènes d'origine bactérienne, de génotoxiques et de substance pouvant réactiver la réplication d'EBV (Poirier, Bouvier *et al.* 1989; Bouvier, Poirier *et al.* 1991).

### *2.3c. Facteurs viraux-Infection par EBV.*

Les NPC sont caractérisés par leur association constante au virus Epstein-Barr. Les EBERs (voir partie 1) sont détectés dans les tumeurs par hybridation in situ. Deux faits suggèrent que l'infection par EBV se produit avant le développement de la tumeur et joue un rôle dans l'oncogénèse : la présence du génome d'EBV dans des lésions pré-malignes ainsi que le caractère monoclonal du génome d'EBV dans les NPC (Raab-Traub and Flynn 1986; Pathmanathan, Prasad *et al.* 1995; Wei and Sham 2005).

## 2.4 Outils biologiques pour l'établissement du diagnostic et du pronostic.

### *2.4a. Outils pour le diagnostic positif.*

En présence d'une tumeur du nasopharynx, la biopsie est indispensable pour affirmer le diagnostic de NPC basé sur la reconnaissance morphologique des cellules malignes. Dans la forme indifférenciée la plus typique, celles-ci ont un aspect pseudo-syncytial, avec des grands noyaux clairs contenant un ou plusieurs nucléoles bien visibles. L'infiltrat inflammatoire composé principalement de petits lymphocytes est très abondant. En pratique, les variantes morphologiques sont innombrables. Une partie des cellules malignes ou la totalité d'entre elles peuvent être plus différenciées avec une architecture en cordons et des ponts d'union. Plus rarement, dans les formes avec différenciation très poussée on détecte des amas de kératine extra-cellulaires.

Les relations spatiales avec l'infiltrat lymphocytaire sont très variables. Dans certains cas les cellules malignes sont dispersées au sein des cellules leucocytaires (lymphocytes T, monocytes, cellules dendritiques etc...). A l'opposé, il peut y avoir des frontières très franches entre les foyers de cellules tumorales et l'infiltrat inflammatoire.

Compte tenu de cette diversité d'architecture et d'aspects cytologiques, il est souvent utile de confirmer le diagnostic morphologique par l'hybridation in situ des EBERs. Ces petits ARN qui sont inclus dans des particules ribonucléoprotéiques résistent à différents procédés de fixation histologique et à l'inclusion en paraffine. Dans tous les cas de NPC EBV-positifs, on constate un marquage intense dans la majorité des cellules malignes, et cela bien que certaines cellules malignes ne soient pas marquées (Yao, Minter *et al.* 2000). L'hybridation in situ des EBERs est particulièrement précieuse lorsqu'on suspecte un NPC devant une adénopathie métastatique du cou

sans tumeur primitive visible dans la cavité nasopharyngée (10% des cas de NPC environ). Les données de la sérologie EBV ou la détection de l'ADN d'EBV circulant ne peuvent fournir que des arguments d'appoint.

#### *2.4b Outils pour le dépistage précoce.*

Les symptômes des NPC sont peu spécifiques : maux de tête, otites, saignement de nez et l'examen de la cavité nasopharyngée requiert un équipement spécialisé. Aussi bien dans les zones d'endémies que dans les pays développés, le diagnostic est souvent tardif, ce qui grève le pronostic. C'est pourquoi il serait utile de disposer d'outils biologiques de dépistage.

Le dépistage revêt une grande importance dans les zones d'endémie et dans les familles à risque. On sait depuis la fin des années 1970, que des modifications de la sérologie EBV précèdent l'apparition d'un NPC ou accompagnent le développement d'une tumeur qui est encore de petite taille (Ho, Ng *et al.* 1976; de-The, Lavoue *et al.* 1978; Sam, Prasad *et al.* 1989). Il s'agit d'anticorps dirigés contre la protéine EBNA1 et contre des protéines précoces et tardives, notamment des protéines du complexe VCA ainsi que la DNase virale ou encore la protéine ZEBRA. Cependant l'utilisation de la sérologie EBV pour le dépistage et le diagnostic précoce des NPC se heurte à des obstacles qui sont bien apparents dans plusieurs études récentes dont celle de Yu et al (Yu, Hsu *et al.* 2011). Cette étude porte sur une cohorte de familles à risque à Taiwan mais les mêmes observations s'appliquent à la population générale dans les différentes zones d'endémie (Chien, Chen *et al.* 2001; Ji, Wang *et al.* 2007). Les tests sérologiques sont assez sensibles mais peu spécifiques. Pour la plupart des antigènes d'EBV considérés, la détection d'IgA permet d'augmenter la spécificité mais en perdant de la sensibilité. Le manque de spécificité se traduit par le fait que parmi les sujets avec sérologie positive, seul un petit nombre vont développer un NPC dans les 5 ans. Ainsi dans l'étude citée, sur 2444 personnes concernées, 380 avaient des IgA anti-EBNA1 détectés par ELISA au-dessus du seuil choisi comme seuil d'alerte et seulement sept ont développé un NPC. Parmi les 2008 personnes en dessous du seuil, sept autres ont développé un NPC (Yu, Hsu *et al.* 2011).

Différentes pistes de recherche sont explorées pour améliorer les performances du dépistage biologiques. L'une d'elles est la mise en évidence d'épitopes immunodominants, cibles privilégiés des anticorps anti-EBV. Fachiroh *et al.* de l'équipe de Jaap Middeldorp en Hollande ont proposé un

test ELISA combinant un peptide dérivé d'EBNA1 et un peptide dérivé de la protéine p18 du complexe VCA (Fachiroh, Paramita *et al.* 2006). Ce test donne de bons résultats chez les patients ayant un NPC connu ; il est actuellement à l'étude dans une perspective de dépistage précoce. La même équipe propose de combiner les examens sérologiques avec un écouvillonnage nasopharyngé, méthode qui présente l'avantage d'être non invasive (Stevens, Verkuijlen *et al.* 2006). Cet écouvillonnage peut être pratiqué sans rhinoscopie. Il est suivi d'une extraction de l'ADN et éventuellement de l'ARN à partir des sécrétions et des placards cellulaires rapportés par le brossage. D'après les résultats de l'équipe de J. Middeldorp, la présence d'un NPC, même de très petite taille entraîne un recueil d'ADN viral très abondant par le brossage. Cette présence d'ADN viral abondant dans la cavité nasopharyngée serait liée au déclenchement du cycle lytique/productif dans de nombreuses cellules malignes à la surface de la tumeur. Si ces données se confirment, elles permettront de limiter le nombre de biopsies nasopharyngées inutiles, sachant que cette procédure est à la fois douloureuse et coûteuse.

Depuis 1998 et les travaux de l'équipe de Yong Poovorawan en Thaïlande, on sait que chez certains patients atteints de NPC (31% à 59% des cas selon les études), de l'ADN viral peut être détecté dans le sérum ou le plasma, permettant une mesure de la charge virale en ADN (Mutirangura, Pornthanakasem *et al.* 1998; Shotelersuk, Khorprasert *et al.* 2000). A l'heure actuelle, la détection de l'ADN circulant d'EBV est considérée comme très prometteuse pour la surveillance post-thérapeutique précoce (voir ci-dessous). En revanche, comme pour la sérologie, des investigateurs de plus en plus nombreux admettent que c'est une approche qui manque de sensibilité et de spécificité. En effet, l'ADN d'EBV n'est pas détectable chez tous les patients NPC alors qu'il est retrouvé dans le plasma de certains sujets sains (environ 10% des donneurs) avec un recouvrement entre les charges (nombres de copies par ml) détectées chez les sujets sains et chez certains patients NPC positifs (J. Middeldorp, Amsterdam ; Anne Lee, Hong-Kong, communications personnelles). Même chez les patients déjà traités pour un NPC, la détection de l'ADN plasmatique d'EBV n'est pas considérée comme un très bon outil de surveillance. Elle ne permet de dépister que 60% des rechutes de petite taille (rT1) (Anne Lee, Hong-Kong, communication personnelle). Il existe des résultats contradictoires sur l'origine de cet ADN viral mais l'ADN viral présent dans le plasma peut être digéré par la Dnase et ne serait donc pas protégé à l'intérieur d'une particule virale. D'autre part, la majorité des molécules d'ADN virales présentes dans le plasma ont une taille inférieure à 181 paires de bases, ce qui est compatible avec la taille de l'ADN fragmenté après apoptose des cellules. L'ADN plasmatique serait donc libéré par les cellules tumorales lors de

l'apoptose des cellules (Mutirangura, Pornthanakasem *et al.* 1998; Jahr, Hentze *et al.* 2001; Chan, Zhang *et al.* 2003) .

#### *2.4c Outils pour le pronostic et la surveillance de l'évolution sous traitement*

Ce thème fait l'objet de beaucoup de recherches et de publications dont on ne traitera pas de façon exhaustive dans cette introduction. Une charge virale initiale élevée est rapportée comme un facteur de mauvais pronostic mais ce facteur n'est sans doute pas indépendant de l'extension tumorale (Lin, Wang *et al.* 2004). La cinétique de décroissance de la charge virale EBV est probablement un indicateur plus intéressant, notamment chez les patients métastatiques traités par chimiothérapie (Lin, Wang *et al.* 2004; Wang, Twu *et al.* 2010).

En dehors des indicateurs liés au virus d'Epstein-Barr, la concentration plasmatique initiale en MIP-3 $\alpha$  (Macrophage Inflammatory Protein-3 $\alpha$ ) apparaît comme un bon indicateur. MIP-3 $\alpha$ , aussi appelée CCL20 ou LARC (liver and activation-regulated chemokine) est une chimiokine exprimée par de nombreuses cellules du système immunitaire et est exprimée dans certains cancers tels que les carcinomes hépatocellulaires, les leucémies, les mélanomes, les adénocarcinomes pancréatiques. L'équipe de Chang a montré que MIP-3 $\alpha$  est surexprimé dans les cellules de NPC. Cette chimiokine est sécrétée par deux lignées de NPC et favorise leur migration et l'invasion cellulaire *in vitro*. La concentration plasmatique de MIP-3 $\alpha$  est plus élevée chez les patients atteints de NPC et peut être utilisée pour le dépistage et la réponse au traitement : une concentration supérieure à 65 ng/ml est un facteur de mauvais pronostic indépendant de l'extension tumorale en analyse multivariée (Chang, Hao *et al.* 2008; Chang, Chang *et al.* 2011). La même équipe travaille à l'utilisation de cet indicateur en combinaison avec la détection d'autres cytokines telles que IL8 et TNF- $\alpha$  (Chang, Chang *et al.* 2011).

### 3) Généralités sur les microARN d'EBV

#### 3.1 Généralités sur les micro-ARN :

##### *3.1.a Découverte :*

Les microARN sont de petits ARN simple brin de 19 à 25 nucléotides. Ils ont été découverts par l'équipe de Victor Ambros en 1993. Les membres de son équipe recherchaient la protéine codée par le gène *lin-4* qui contrôle le développement larvaire de *C.elegans* et réprime l'expression de la protéine *lin-14*. La protéine codée par *lin-4* restait introuvable et ils finirent par démontrer que ce gène ne code pas pour une protéine mais pour deux petits ARN non traduits de 66 et 22 nucléotides ; l'un étant le précurseur de l'autre (Lee, Feinbaum *et al.* 1993; Bartel 2004). Il a ensuite été montré que le plus petit des deux ARN est complémentaire de l'extrémité 3' du gène *lin-14* et que cette complémentarité est indispensable à la répression de *lin-14* par *lin-4* (Wightman, Burglin *et al.* 1991; Lee, Feinbaum *et al.* 1993; Ha, Wightman *et al.* 1996; Bartel 2004). Un autre microARN : *let-7* fut ensuite découvert chez *C.elegans*. Il réprime l'expression de *lin-41* par complémentarité avec l'extrémité 3' de l'ARNm (Reinhart, Slack *et al.* 2000). L'équipe de Ruvkun a montré en 2000 que *let-7* était retrouvé chez plusieurs espèces animales dont la drosophile et l'homme (Pasquinelli, Reinhart *et al.* 2000). Il fallut ensuite attendre 2001 et l'analyse systématique des petits ARN chez *C.elegans* et dans les cellules Hela pour comprendre que ces deux microARN n'étaient pas isolés mais au contraire que de nombreux microARN étaient exprimés dans les cellules de mammifères. Il a été prouvé que leur séquence est conservée au cours de l'évolution ce qui suggère une grande importance fonctionnelle (Lee and Ambros 2001). Depuis, des centaines d'autres microARN ont été découverts dans les cellules de multiples espèces animales. L'existence de microARN chez les plantes et les animaux, ainsi que les modes communs de synthèse et de fonction, suggèrent une origine très ancienne chez un ancêtre commun peut-être unicellulaire (Bartel 2004). On estime que 30 à 50% des gènes sont soumis à une régulation par les microARN et on compte environ 700 microARN humains (Huntzinger and Izaurralde 2011).

Contrairement à ce qui avait été envisagé lors de la découverte, on sait maintenant que l'expression de ces microARN n'est pas seulement régulée dans le temps, au cours des différentes phases du développement. En effet, la distribution des différents microARN est aussi spécifique des cellules et tissus : ainsi *miR-1* est majoritairement exprimé dans le cœur chez l'homme et chez la souris où il

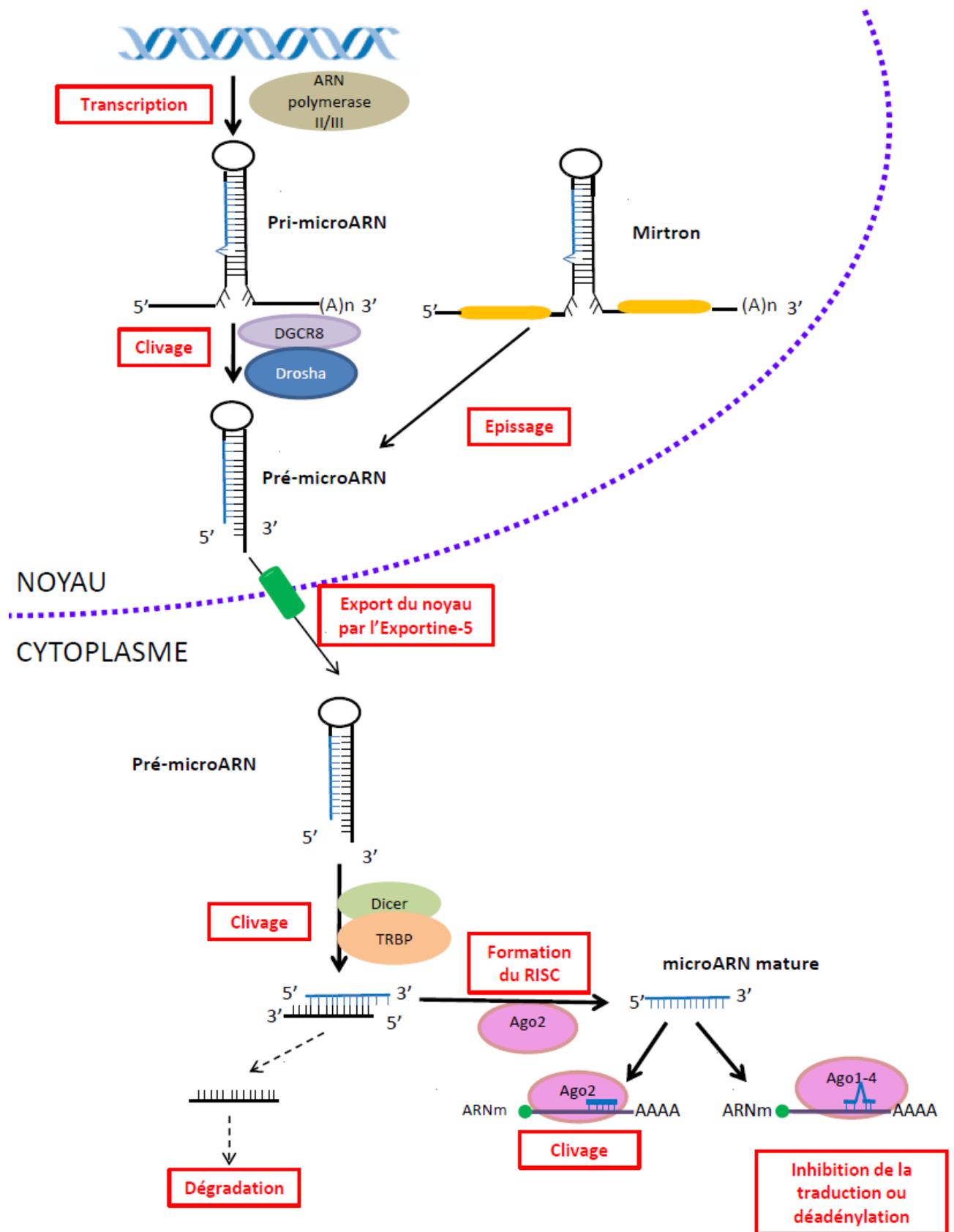
représente jusqu'à 45% de tous les microARN exprimés (Lee and Ambros 2001; Lagos-Quintana, Rauhut *et al.* 2002). En conséquence, ces petits ARN qui avaient tout d'abord été appelés « small temporal RNA » sont désormais qualifiés des microARN ou miRNA (Lagos-Quintana, Rauhut *et al.* 2001; Lau, Lim *et al.* 2001; Lee and Ambros 2001; Bartel 2004).

### 3.1.b. Biogénèse

Les microARN sont produits en plusieurs étapes (**Figure 4**) : ils sont d'abord transcrits en pri-microARN ou pri-miRNA à partir de différentes régions du génome. Les gènes codant pour les microARN peuvent être retrouvés en dehors des gènes codants, dans des régions inter-géniques (**voir figure 5**) (Lee and Ambros 2001). Néanmoins, les microARN sont aussi exprimés à partir d'introns à l'intérieur d'un gène codant pour des ARNm (microARN introniques) , ainsi miR-7 est retrouvé dans l'intron de la protéine hnRNP k chez les insectes et les mammifères (Aravin, Lagos-Quintana *et al.* 2003; Bartel 2004). En fait, on estime qu'environ 50% des gènes de microARN sont introniques (Griffiths-Jones, Saini *et al.* 2008). L'expression de ces gènes introniques peut être associée à l'expression du gène qui les héberge mais ce n'est pas toujours le cas. En effet, les niveaux d'expression du microARN et du gène hôte ne sont pas toujours corrélés. L'équipe de Monteys a montré que des promoteurs dépendant de la polymérase II (permettant l'expression des ARN messagers) ou III (transcription des ARNt) étaient présents dans les introns de gènes hébergeant les gènes de microARN et ont ainsi prouvé que miR-128-2 peut être transcrit grâce au promoteur du gène l'hébergeant mais aussi indépendamment de celui-ci (Ozsolak, Poling *et al.* 2008; Wang, Xuan *et al.* 2009; Monteys, Spengler *et al.* 2010). L'expression peut se faire par transcription d'ARN polycistronique et expression d'un groupe de microARN mais la majorité des gènes des microARN sont isolés (Lim, Glasner *et al.* 2003; Lim, Lau *et al.* 2003). Les pri-microARN ainsi produits sont de longs transcrits comportant des structures en tige-boucle (Lau, Lim *et al.* 2001).

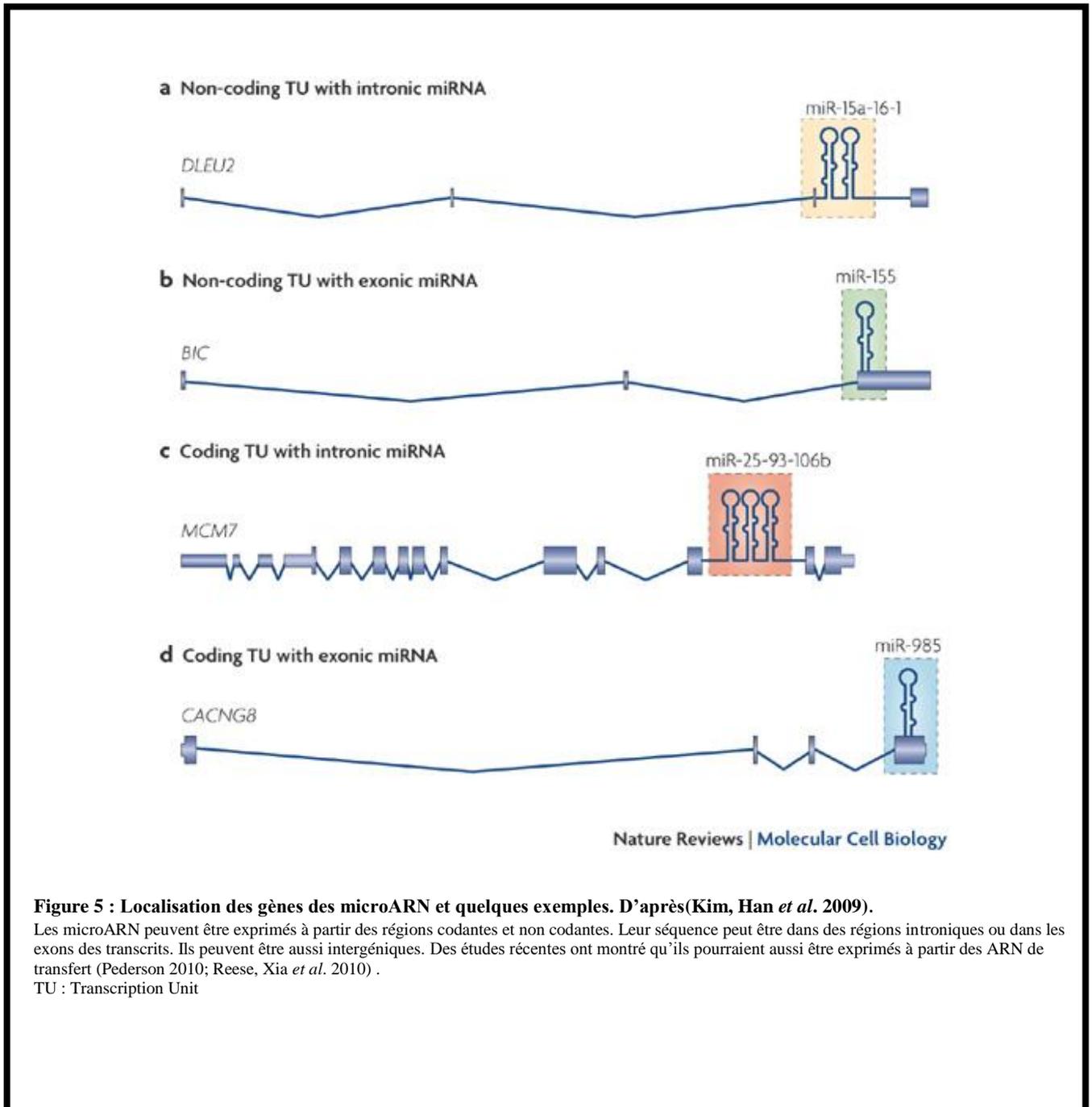
Les pri-microARN sont ensuite clivés en pré-microARN d'environ 70 nucléotides par La RNase III Drosha qui est présente au sein d'un complexe protéique qualifié de « complexe microprocesseur » ou « Microprocessor complex » de 500kDa chez la drosophile et C.elegans et de 650kDa chez l'homme. Au sein de ce complexe protéique, un cofacteur est nécessaire au clivage du pri-microARN en pré-microARN : Pasha chez la drosophile et C.elegans et DGCR8 (Di George syndrome Critical region gene 8) chez l'homme (Lee, Jeon *et al.* 2002; Lee, Ahn *et al.* 2003; Denli,

Tops et al. 2004). C'est le clivage par Drosha qui détermine la séquence du microARN mature : DGCR8/Pasha interagit avec les segments simple brin et la tige double brin d'environ 33 paires de base du pri-microARN et assiste Drosha qui clive le substrat à 11pb de la jonction entre les segments simples brins et doubles brins à la base de la tige (voir **figure 6**) (Zeng and Cullen 2005; Yeom, Lee *et al.* 2006).



**Figure 4 (Page précédente): Mécanismes de biogenèse des microARN et mécanismes d'action, à partir de (Filipowicz, Bhattacharyya *et al.* 2008; Winter, Jung *et al.* 2009).**

Les microARN sont transcrits par l'ARN polymérase II ou III en pri-microARN qui sont ensuite clivés en pré-microARN de 70 nucléotides par Drosha et DGCR8. Les pré-microARN sont alors exportés du noyau par l'exportine5 et clivés en duplex de microARN par Dicer. Le microARN mature est ensuite pris en charge par le complexe RISC comprenant les protéines Argonaute Ago, la protéine GW182 ou TNRC6. Le microARN mature est alors associé à l'ARNm cible. Si le microARN et l'ARNm sont parfaitement complémentaires, l'ARNm est clivé. Si la complémentarité est imparfaite, la traduction est inhibée et l'ARNm subit une déadénylation dans les P-bodies et est ensuite dégradé.

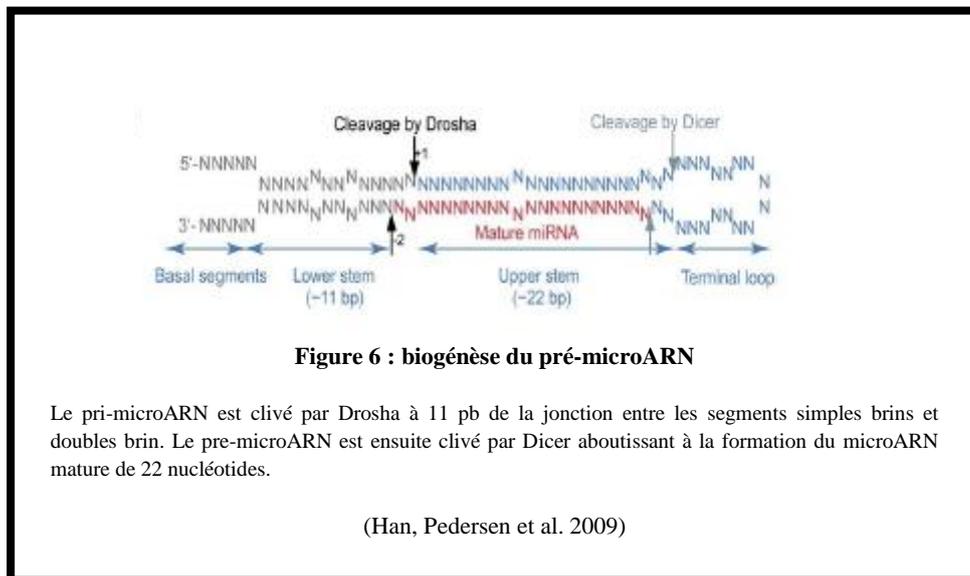


**Figure 5 : Localisation des gènes des microARN et quelques exemples. D'après (Kim, Han *et al.* 2009).**

Les microARN peuvent être exprimés à partir des régions codantes et non codantes. Leur séquence peut être dans des régions introniques ou dans les exons des transcrits. Ils peuvent être aussi intergéniques. Des études récentes ont montré qu'ils pourraient aussi être exprimés à partir des ARN de transfert (Pederson 2010; Reese, Xia *et al.* 2010).

TU : Transcription Unit

Les pré-microARN sont ensuite exportés du noyau par l'exportine 5 en présence de Ran-GTP (Lund, Guttinger et al. 2004) (voir **figure 4**).



La compréhension des mécanismes de biogénèse des microARN matures a débuté par l'observation en Northern blot de microARN d'environ 22 nucléotides mais aussi d'ARN plus long (70 nucléotides environ) dont l'analyse structurale a permis de déterminer qu'ils formaient une structure en tige-boucle. Il fut alors envisagé que ces pre-microARN étaient les précurseurs des microARN (Lee, Feinbaum *et al.* 1993). Or, il était déjà connu que la RNase III multi-domaines Dicer pouvait générer des siRNA, autres petits ARN non-codants de même taille que les microARN, à partir d'un long précurseur double-brin. Il a alors été envisagé que Dicer pouvait aussi être responsable du clivage des pré-microARN en microARN matures. La validité de cette hypothèse a été démontrée par la capacité de Dicer purifiée par immunoprécipitation à cliver les pré-microARN en microARN matures (Bernstein, Caudy *et al.* 2001; Grishok, Pasquinelli *et al.* 2001; Ketting, Fischer *et al.* 2001; Knight and Bass 2001). Dicer est une protéine conservée qui contient un domaine hélicase, un ou deux sites de liaison à l'ARN double brin et deux domaines RNase de type III. Dans le cytoplasme, Dicer ( ou DCR-1 homologue de Dicer chez *C.elegans*) clive le précurseur double brin en ARN de 19 à 25 nucléotides à partir de l'extrémité 3' du pré-microARN reconnu par le domaine PAZ de la protéine (Ketting, Fischer *et al.* 2001; Zeng, Yi *et al.* 2005; MacRae, Zhou *et al.* 2007).

En dehors de cette voie canonique, il existe d'autres voies de synthèse des microARN sans Drosha : c'est le cas des « mirtrons » présents dans des introns excisés au cours de l'épissage et exportés du

noyau sans clivage supplémentaire par Drosha (**voir figure 4**). Certains autres microARN peuvent être produits sans clivage par Dicer (Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010).

### *3.1.c. Mécanismes d'inhibition de l'expression des protéines par les microARN*

Dans la quasi-totalité des cas, les microARN inhibent l'expression de leur ARNm cible.

L'un des brins du microARN mature (généralement celui qui a le moins de complémentarité en 5') s'associe avec un membre de la famille des protéines argonautes notamment l'argonaute 2 ou Ago2 et forme alors le cœur d'un complexe protéique : le miRISC (miRNA-induced silencing complex) dans lequel est retrouvée la protéine GW182(GW-bodies containing) aussi appelée TNRC6A (Trinucleotide-Repeat-Containing-Gene-6A) qui interagit avec AGO2 (Tuschl, Zamore *et al.* 1999; Hammond, Bernstein *et al.* 2000; Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010; Huntzinger and Izaurralde 2011). L'autre brin est généralement dégradé (Lau, Lim *et al.* 2001; Miyoshi, Miyoshi *et al.* 2010) mais il existe des exceptions (Baillat and Shiekhattar 2009; Gibbings, Ciaudo *et al.* 2009; Gibbings and Voinnet 2010; Iizasa, Wulff *et al.* 2010).

Les résidus 2 à 8 du microARN mature (séquence « seed ») complémentaires de l'ARNm ciblé constituent les séquences les plus conservées chez les microARN de métazoaires et sont particulièrement importants pour l'association entre le microARN mature et sa cible (Lewis, Shih *et al.* 2003; Lim, Lau *et al.* 2003). La complémentarité du microARN avec cette séquence est d'ailleurs un des critères utilisés pour rechercher les cibles des microARN par des méthodes bioinformatiques. Néanmoins, il semble que dans certains cas cette séquence « seed » ne soit pas absolument nécessaire pour la répression de l'expression de l'ARNm cible (Lai 2002; Lal, Navarro *et al.* 2009). Un microARN peut cibler différents ARNm et un même ARNm peut être ciblé par différents microARN.

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer l'action des microARN :

#### - le clivage de l'ARNm

En cas de forte complémentarité entre le microARN et l'ARNm cible, le clivage par certaines protéines Ago (Ago2 mais pas Ago 1 ou3) se produit entre les bases de l'ARNm s'appariant avec les bases 10 et 11 du microARN. C'est le domaine PIWI de la protéine Argonaute qui est responsable du clivage de l'ARNm (Hutvagner and Zamore 2002; Bartel 2004; Baillat and

Shiekhattar 2009). Cependant, cette situation est rare chez les mammifères pour lesquels la plupart des microARN ne sont pas parfaitement complémentaires de l'extrémité 3' de l'ARNm cible. Des anomalies de séquences jusqu'à 4 bases peuvent être tolérées et l'absence de complémentarité parfaite entre le microARN et l'ARNm cible induit la répression de la traduction ou la dégradation de l'ARNm par un mécanisme différent du clivage endolytique (Saxena, Jonsson *et al.* 2003).

#### -l'inhibition de la traduction protéique

Les mécanismes d'inhibition de l'expression des protéines ne sont pas totalement élucidés et les résultats des différentes études sont parfois contradictoires. Certaines expériences montrent que la traduction est inhibée après son initiation, ce qui est conforté par l'observation d'une association des microARN aux polysomes après purification sur gradients de sucrose (Huntzinger and Izaurralde 2011). Une autre hypothèse est l'association d'AGO2 avec la coiffe de l'ARNm située en 5' ce qui empêcherait la liaison avec le complexe eIF4F nécessaire à l'initiation de la traduction. En effet, s'il n'y a pas de coiffe en 5', si les protéines sont traduites à partir d'un IRES ou si la concentrations de eIF4F augmente, l'inhibition de la traduction par les microARN est atténuée (Beezhold, Castranova *et al.* 2010; Huntzinger and Izaurralde 2011).

#### -le clivage de la coiffe en 5' et la déadénylation de l'ARNm suivi de la dégradation de l'ARNm par une exonucléase dans le sens 5' vers 3'

Un mécanisme d'action des microARN par dégradation de l'ARNm cible est démontré par diverses observations : si on surexprime un microARN particulier dans une cellule alors la quantité du transcrit cible peut diminuer (Selbach, Schwanhausser *et al.* 2008). A l'inverse, si on inhibe un facteur nécessaire à l'action des microARN (Dicer, Ago ou GW182), les ARNm cibles des microARN deviennent plus abondants. De plus, les niveaux d'expression des ARNm et des protéines cibles sont généralement corrélés et, au sein de la cellule, les microARN associés aux ARNm sont retrouvés dans des régions particulières : les « P bodies » qui sont des sites de stockage et de dégradation des ARNm (Jakymiw, Pauley *et al.* 2007).

Un des mécanismes possibles serait alors l'association entre la protéine GW182 du RISC et la protéine de liaison à la queue polyA PAPB (PolyA binding protein), suivi de la déadénylation de l'ARNm par le complexe CAF1-CCR4-NOT puis la dégradation de l'ARNm par l'exonucléase XRN1. Cette hypothèse est soutenue par l'observation de l'augmentation de l'expression des cibles de microARN si le complexe responsable de la déadénylation est inhibé (Huntzinger and Izaurralde 2011).

La coiffe de l'ARNm est ensuite dégradée par le complexe Dcp1-Dcp2 (Decapping protein)(Chen, Zheng *et al.* 2009).

La dégradation de l'ARNm pourrait se produire dans une deuxième étape après l'inhibition de la traduction (**Figure 9**) (Gibbings and Voinnet 2010).

### *3.1.d : Nomenclature :*

Les micro-ARN décrits dans les différentes espèces sont enregistrés et répertoriés sur un site internet mirBase :[www.mirbase.org](http://www.mirbase.org).(Griffiths-Jones, Grocock *et al.* 2006). Ce site reprend les noms des microARN, leur séquence, leurs précurseurs, leurs cibles connues ainsi que des liens vers des algorithmes permettant de prédire les cibles potentielles. Les microARN sont désignés par un chiffre qui correspond à l'ordre de découverte des différents microARN. Si des microARN ont la même séquence mais proviennent de différentes régions du génome, il leur est alors attribué un suffixe numérique (miR-6-1 et miR-6-2 par exemple). Des séquences ne différant que d'une ou deux bases auront des lettres comme suffixes (par ex miR-181a et miR-181b).

Dans certains cas, deux microARN peuvent être produits à partir de chacun des deux brins complémentaires du même précurseur (Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones, Grocock *et al.* 2006). Si le microARN le plus majoritairement exprimé est connu, on ajoute un astérisque à côté du nom du microARN minoritaire. Si on ne sait pas quelle est la forme majoritaire, la nomenclature la plus répandue est de rajouter les suffixes -5p et -3p pour les microARN exprimés à partir du brin 5' ou 3' de la tige du pre-microARN respectivement.

La notation mir-16 correspond au précurseur et miR-16 au microARN de 22 nucléotides excisé à partir du précurseur (Griffiths-Jones 2004).

Le préfixe de 3 ou 4 lettres désigne l'espèce. « Hsa » correspond à l'espèce humaine, « cel » pour *C.elegans*, « ebv » pour Epstein-Barr virus.

### *3.1.e : Fonctions biologiques connues et implication des microARN dans les cancers : oncomirs et miRs supresseurs de tumeurs :*

Les microARN ont de multiples fonctions : le contrôle de la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, le métabolisme des lipides chez la mouche, le contrôle du développement des lignées hématopoïétiques chez les mammifères et le contrôle du développement des feuilles et des fleurs chez les plantes. Une dérégulation de l'expression des microARN est associée à de nombreuses maladies humaines (Bartel 2004).

De multiples microARN ont été impliqués dans le développement et la progression de cancers chez l'homme et une diminution globale de l'expression des microARN est fréquemment observée dans les tumeurs (Gaur, Jewell *et al.* 2007).

Certains microARN agissent tels des oncogènes et sont alors qualifiés d'« **oncomirs** ». Ces microARN sont surexprimés dans les cancers et ils participent à l'oncogenèse en diminuant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs ou de gènes intervenant dans la différenciation cellulaire ou l'apoptose (Babashah and Soleimani 2011) . Ainsi, miR-21 diminue l'expression de la tropomyosine 1 et de PDC4 (programmed cell death 4), deux gènes suppresseurs de tumeurs et est fréquemment surexprimé dans les cancers tels que les cancers du poumons, du sein, du pancréas, de l'œsophage ou du colon (Babashah and Soleimani 2011).

D'autres microARN sont qualifiés de **microARN suppresseurs de tumeurs**. Leur expression est diminuée dans les tumeurs, ce qui conduit à l'augmentation de l'expression d'oncogènes. Ainsi, let-7 réprime l'oncogène ras et HMGA2 (High mobility group A2). Dans des tissus de cancer des poumons, l'équipe de Johnson a retrouvé des niveaux d'expression diminués du microARN let-7 associés à une augmentation de l'expression de la protéine RAS (Johnson, Grosshans *et al.* 2005). MiR-15 et miR-16 régulent eux l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL2.

Au-delà de la dérégulation de l'expression de certains microARN dans les tumeurs, on observe parfois une modification de l'expression de certaines protéines impliquées dans la biogénèse ou la fonction des microARN (Kumar, Lu *et al.* 2007). On estime par exemple que 27% des tumeurs ont une délétion hémizigote du gène codant pour Dicer qui semble être un suppresseur de tumeur fonctionnant par haplo-insuffisance. De plus, le knockdown de Dicer, Drosha ou DGC8 favorise le développement de tumeurs (Kumar, Pester *et al.* 2009).

### 3.2. Dérégulation de l'expression de miRNA cellulaires par EBV

L'infection par EBV induit une diminution globale (99.5%) des microARN cellulaires dont certains microARN suppresseurs de tumeurs : let-7, miR-1 et miR-196 (Godshalk, Bhaduri-McIntosh *et al.* 2008). L'expression de la LMP1, la principale protéine oncogène du virus Epstein-Barr, induit une augmentation de l'expression de deux microARN cellulaires : hsa-miR-155 et hsa-miR-146a en activant Nf-κB qui se lie au promoteur de ces microARN. Hsa-miR-155 participe à l'activation des cellules B et T après une stimulation immunologique. Le transcrit dont est originaire ce microARN

avait déjà été décrit dans les années 1990 comme un transcrite non codant : le transcrite BIC (B-cell receptor inducible gene) situé en amont du site d'intégration de virus des leucémies avaires et activé dans les lymphomes associés à ce virus. Il aurait donc un rôle dans l'oncogenèse (Tam, Ben-Yehuda *et al.* 1997; Yin, McBride *et al.* 2008). Ce microARN est absent dans les cellules de lymphome de Burkitt mais exprimé dans les lignées lymphoblastoïdes en latence de type III (Kluiver, Haralambieva *et al.* 2006; Yin, McBride *et al.* 2008).

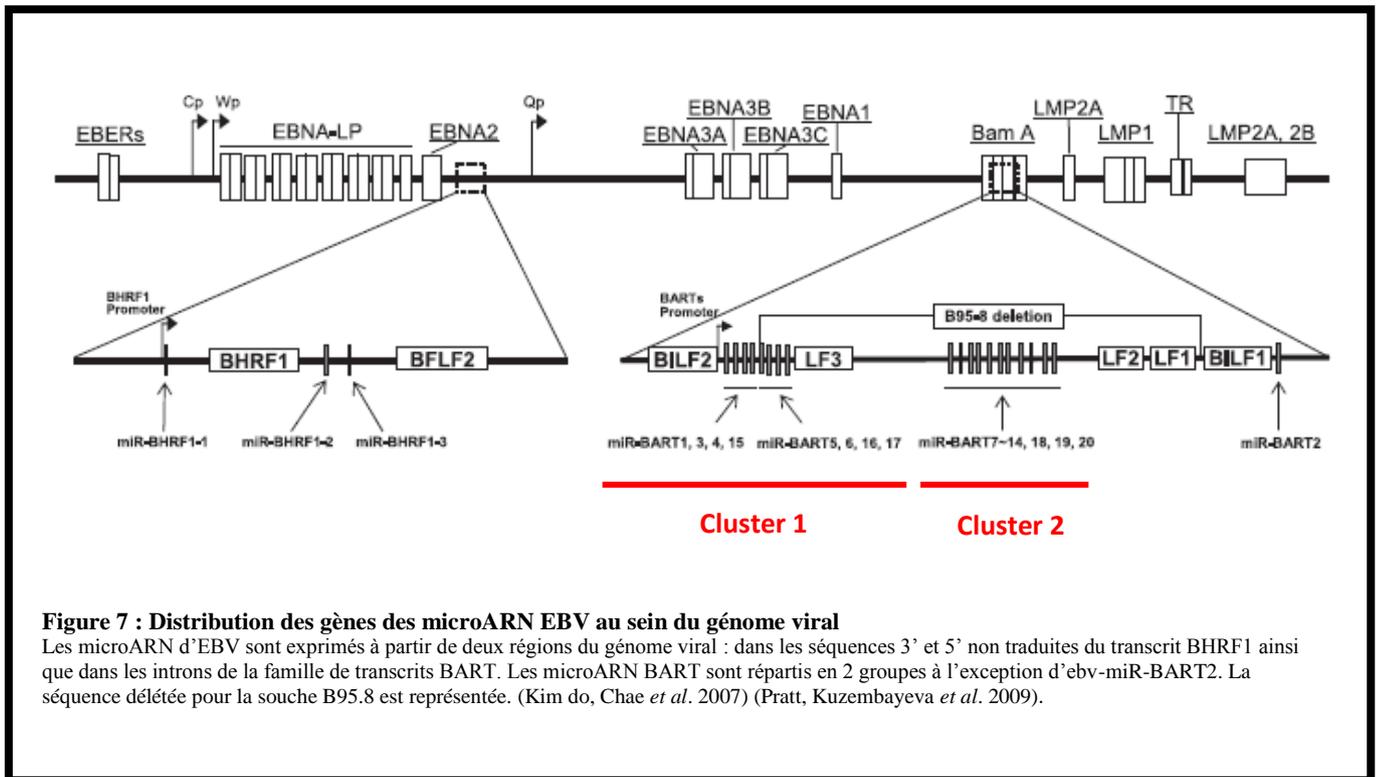
Les cibles de hsa-miR-146a (STAT1 et IRAK1, TRAF6 notamment) appartiennent à la voie de réponse à l'interféron stimulée entre-autre par la LMP1. La surexpression de ce microARN constituerait donc un rétrocontrôle négatif de cette voie de signalisation (Motsch, Pfuhl *et al.* 2007; Cameron, Yin *et al.* 2008; Gatto, Rossi *et al.* 2008; Godshalk, Bhaduri-McIntosh *et al.* 2008).

MiR-15a et miR-16 sont surexprimés dans des biopsies de NPC et inhibent l'expression du suppresseur de tumeur BRCA1, ce qui participe peut-être au développement de ces tumeurs (Zhu, Pfuhl *et al.* 2009).

### 3.3. Les microARN du virus Epstein-Barr.

#### *3.3.a. Découverte :*

Les microARN du virus d'Epstein-Barr ont été les premiers microARN viraux découverts pour un virus humain. Ils ont été découverts par analyse systématique et séquençage des petits ARN présents dans des lignées de lymphome de Burkitt infectées de façon latente. Certaines des séquences obtenues avaient une structure en tige-boucle caractéristique des gènes des microARN. La présence de cinq microARN viraux a ensuite été confirmée par Northern Blot. Ces microARN sont présents au sein de deux groupes ou clusters: un groupe dans les régions 5' et 3' non traduites de la séquence de l'ARN messager de BHRF1 et sont nommé miR-BHRF1. L'autre groupe est exprimé à partir des introns d'une famille de transcrits BART. Ces transcrits très abondants dans les cellules infectées sont longtemps restés un mystère car il était impossible de trouver la ou les protéines exprimées à partir des transcrits BART produits par épissage alternatif (Pfeffer, Zavolan *et al.* 2004). Les microARN BART sont regroupés dans deux groupes ou clusters I et II à l'exception de ebv-miR-BART2 (**voir figure 7**) (Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009). Depuis, de nombreux autres microARN d'EBV ont été découverts et on en compte actuellement 44 référencés dans miRBase exprimés à partir de 25 précurseurs.



### 3.3. b Expression dans les tumeurs et lignées cellulaires infectées par EBV

#### -expression des microARN BHRF1 :

D'après l'étude réalisée par Cai et ses collègues en 2006, l'expression des différents microARN du groupe BHRF1 est corrélée au type de latence retrouvé dans les cellules : ainsi, les cellules en latence de type III expriment les miR-BHRF1 alors qu'ils sont, en revanche, pas ou peu exprimés dans les cellules en latence I ou II. L'expression des microARN du cluster BHRF1 dépend de l'activation des promoteurs Cp et/ou Wp, ce qui explique leur présence dans les cellules en latence III mais pas dans les cellules en latence I ou II (cf premier chapitre et **figure 2**). Ainsi, BHRF1-3 est abondant dans les cellules issues de lymphomes de Burkitt après plusieurs passages en culture et dans les lymphomes associés à l'infection par HIV (latence III). En revanche, on ne détecte pas ou

peu de BHRF1-3 dans des cellules primaires de lymphomes de Burkitt ou dans des cellules de carcinomes gastriques (latence I et II) (Kim do, Chae *et al.* 2007; Xia, O'Hara *et al.* 2008; Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009). Les microARN BHRF1 sont très faiblement exprimés dans la lignée C666-1, une lignée de carcinome naso-pharyngé où ils sont détectés en PCR quantitative mais pas en Northern blot et sont absents dans les biopsies de NPC (Cosmopoulos, Pegtel *et al.* 2009). Dans certaines lignées (Jijoye), on note une expression importante de BHRF1-2 mais pas de BHRF1-1 ce qui est peut être dû à une modification de la séquence du précurseur de BHRF1-1 qui empêcherait le clivage en microARN mature (Cai, Schafer *et al.* 2006) .

#### -expression des microARN BART :

Les niveaux d'expression des BART ne semblent pas spécifiques d'un type cellulaire particulier (Edwards, Marquitz *et al.* 2008). Ils sont très abondants dans des cellules primaires de NPC mais aussi dans les lignées dérivées de NPC (C666-1 et C15 par exemple) et dans des cellules issues de carcinomes gastriques associés à EBV (Cosmopoulos, Pegtel *et al.* 2009; Zhu, Pfuhl *et al.* 2009). Néanmoins, ils ne sont pas détectés dans toutes les lignées épithéliales infectées par EBV : pas d'expression dans les lignées NPC-KT (lignée de NPC) et AGS-Akata (lignée de carcinome gastrique). Les niveaux d'expression dans les cellules de lymphome de Burkitt varient beaucoup d'une lignée à l'autre (Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009).

L'expression des miR-BART est corrélée à l'expression de la famille de transcrits BART. Cependant, les niveaux d'expression des différents miR-BART ne sont pas identiques entre-eux : dans les C666-1, miR-BART7 est 6 fois plus abondant que miR-BART12. Cette observation pourrait être expliquée par une reconnaissance variable des pri-microARN par le complexe microprocesseur, par une stabilité plus ou moins importante des pre-miRNA clivés ou des anomalies de maturation de certains précurseurs des BART en microARN matures (Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009). Le nombre de copies des microARN de la famille BART par cellule n'est pas corrélé au nombre de copies du génome viral dans les cellules mais s'accroît après l'infection par le virus (Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009)

Certaines lignées ont été infectées par la souche B95.8 d'EBV qui contient une délétion d'une partie du groupe 1 et du groupe 2 des BART, seuls les BART 3, 4, 1-5p 15 et 2 sont exprimés (**voir Figure 7**) (Barth, Pfuhl *et al.* 2008; Pratt, Kuzembayeva *et al.* 2009).

### 3.3.c Cibles et fonctions (**Table1**)

La conservation de certains microARN retrouvés chez les lymphocryptovirus de Rhésus et d'EBV montre l'importance biologique de ces microARN. Dès leur découverte par Pfeffer en 2004, les cibles des microARN d'EBV ont été activement recherchées dans le but de comprendre la fonction de ces microARN viraux dans le cycle viral, l'établissement de la latence ainsi que leur rôle éventuel dans l'oncogenèse virale (Pfeffer, Zavolan et al. 2004; Cai, Schafer et al. 2006; Choy, Siu et al. 2008; Walz, Christalla et al. 2010).

### *3.3.d. Fonctions oncogéniques : altération de gènes cellulaires.*

Les BART ne semblent pas indispensables à l'oncogenèse : la souche B95.8 a conservé sa capacité à transformer les cellules alors qu'elle comporte une délétion induisant la perte de l'expression de la plupart des miR-BART. Les BART ne sont pas indispensables à la transformation de lymphocytes B en LCL (Rowe, Kelly *et al.* 2009), néanmoins, certains microARN d'EBV semblent protéger les cellules infectées de l'apoptose ou de la reconnaissance par le système immunitaire. Ainsi, BHRF1-3 réprime l'expression de la chimiokine CXCL-11/I-TAC induite par l'interféron et est responsable d'une attraction des cellules T en se liant au CXCR3. EBV, en diminuant l'expression de cette protéine grâce à miR-BHRF1-3, pourrait ainsi empêcher la reconnaissance des lymphocytes B infectés par les lymphocytes T (Xia, O'Hara *et al.* 2008). MiR-BART5 cible la protéine PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) qui est une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl2 et induit l'apoptose. Ceci pourrait ainsi augmenter la résistance à l'apoptose des cellules infectées par EBV (Choy, Siu *et al.* 2008).

Ebv-miR-BART6 a un impact global sur les micro-ARN cellulaires. En effet, l'équipe de Kazuko Nishikura a montré que ebv-miR-BART6-5p pouvait cibler Dicer et inhiber ainsi son expression entraînant par conséquent une diminution de l'expression de nombreux microARN matures (Iizasa, Wulff *et al.* 2010). Les résultats de cette étude sont cohérents avec l'observation de la diminution globale de l'expression des microARN cellulaires dans les cellules infectées par EBV (Godshalk, Bhaduri-McIntosh *et al.* 2008).

Des virus recombinants dont le génome est délété pour la région permettant l'expression des miR-BHRF1 ont une capacité transformante 20 fois inférieure à celle du virus sauvage. Les microARN du cluster BHRF1 accélèrent ainsi l'expansion des lymphocytes infectés par EBV et jouent donc certainement un rôle dans la transformation associée à l'infection virale (Feederle, Linnstaedt et al. 2011).

<b>CIBLES CELLULAIRES</b>		
<b>miR</b>	<b>Cible</b>	<b>Fonction</b>
<b>miR-BART5</b>	<b>PUMA</b>	<b>Protéine pro-apoptotique</b>
<b>miR-BHRF1-3</b>	<b>CXCL11</b>	<b>Chimiokine, attire les lymphocytes T</b>
<b>miR-BART6</b>	<b>Dicer</b>	<b>Biogenèse des microARN</b>
<b>CIBLES VIRALES</b>		
<b>miR</b>	<b>Cible</b>	<b>Fonction</b>
<b>miR-BART2</b>	<b>BALF5</b>	<b>ADN polymérase virale</b>
<b>miR-BART du cluster 1</b>	<b>LMP1</b>	<b>Principale protéine oncogène virale</b>

**Table 1 : Cibles des microARN d'EBV. D'après (Grundhoff and Sullivan 2011) .**

### *3.3.e Régulation de l'expression virale*

#### -Inhibition de l'expression des gènes lytiques

D'autres microARN interviennent dans le cycle viral en régulant l'expression de certaines protéines virales. Ebv-miR-BART2 est complémentaire de l'extrémité 3' non traduite de l'ARNm de l'ADN polymérase virale BALF5. L'équipe de Friedrich Grässer a montré que miR-BART2 induit le clivage de l'ARNm de BALF5 par complémentarité parfaite avec l'extrémité 3' non traduite. La

transfection de cellules par un plasmide permettant l'expression de miR-BART2 induit une diminution de l'expression d'un gène rapporteur associant l'extrémité 3' non traduite de BALF5 à la luciférase de 40 à 50%. Néanmoins, miR-BART2 est exprimée à des niveaux très faibles et uniquement lors de l'infection latente ce qui suggère que ce micro-ARN empêche l'expression de BALF5 pendant la phase latente et donc inhibe le déclenchement du cycle lytique (Barth, Pfuhl *et al.* 2008).

#### -Atténuation de l'expression de protéines oncogéniques : LMP1 et LMP2

L'équipe de Diane Hayward a montré en 2007 que les microARN BART appartenant au groupe 1 peuvent cibler l'ARNm de l'oncoprotéine virale LMP1 et diminuer son expression induisant alors une diminution de l'activation de la voie Nf- $\kappa$ B par la LMP1 dans les cellules de NPC (Lo, To *et al.* 2007).

La protéine virale LMP2A est une cible potentielle du microARN viral ebv-miR-BART22. Ce microARN pourrait donc diminuer l'expression de la LMP2A dont les peptides sont reconnus par les cellules du système immunitaire et participer ainsi au camouflage des cellules infectées (Lung, Tong *et al.* 2009)

D'autre part, l'inhibition de l'expression des protéines oncogènes virales LMP1 et LMP2 pourrait permettre la survie des cellules épithéliales infectées en évitant l'accumulation trop importante de ces deux protéines mal tolérées par ces cellules.

## 4) Introduction à la biologie des exosomes

Les cellules communiquent entre-elles à proximité ou à distance par sécrétion de molécules solubles (hormones, cytokines), la formation de jonctions inter-cellulaires (gap jonctions, nanotubes), par contact membranaire (notamment contact d'un ligand membranaire avec un récepteur membranaire porté par la cellule adjacente) mais aussi par l'échange de différentes vésicules extra-cellulaires. Parmi ces vésicules extra-cellulaires qui contribuent aux communications inter-cellulaires, les plus étudiées sont des nanovésicules appelées exosomes qui font l'objet de ce chapitre.

### 4.1 Structure, biogenèse et composition biochimique des exosomes :

*4.1.a Place des exosomes parmi l'ensemble des vésicules libérées par différents types de cellules eucaryotes ( voir **table 2**):*

Différentes vésicules peuvent être produites par les cellules : corps apoptotiques, microvésicules, exosomes, ectosomes, prostasomes, microparticules, prominosomes (Simons and Raposo 2009). Pour la plupart des auteurs, le classement des vésicules dans les différentes catégories dépend de leur taille, de leur origine et de leur composition protéique et lipidique.

	Exosomes	Microvésicules	Ectosomes	Particules membranaires	Vésicules ressemblant aux exosomes « Exosomes-like vesicles »	Corps apoptotiques
Taille	40-100nm	100-1000nm	50-200nm	50-80nm	20-50nm	50-500nm
Densité sur gradient de sucrose	1,13-1,19g/ml	Ind	Ind	1,04-1,07g/ml	1,1g/ml	1,16-1,28g/ml
Aspect en microscopie électronique	En forme de cupule	Forme irrégulière	Structures bilamellaires	Rondes	Forme irrégulière	Hétérogènes
Sédimentation	100 000g	10 000g	160 à 200 000g	100 à 200 000g	175 000g	1,2 ; 10 ou 100 000g
Composition lipidique	Enrichis en cholestérol, sphingomyéline et céramide. Contient des radeaux lipidiques. Phosphatidylsérine exposée	Phosphatidylsérine exposée	Enrichis en cholestérol et diacylglycérol, phosphatidylsérines exposées	Ind	Ne contient pas de radeaux lipidiques	ind
Marqueurs protéiques	Tétraspansines : CD63 et CD9, Alix et TSG101	Intégrines, sélectines et des ligand du CD40	CR1, enzymes protéolytiques, absence de CD63	CD133, pas de CD63	TNFR1	Histones
Origine cellulaire	Endosomes	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Membrane plasmique	Ind peut-être compartiments internes	Ind

**Tableau 2 : Description des diverses vésicules extra-cellulaires libérées par les cellules.**

Adapté de (Thery, Ostrowski *et al.* 2009) et de (Barrès 2009). Ind : indéterminé.

### Les microparticules ou « shedding vesicles » ou microvésicules:

Les microparticules ou microvésicules sont de grande taille (100nm à 1µm), hétérogènes et sont produites par bourgeonnement de la membrane plasmique. Elles sont libérées après une stimulation (stress, apoptose, activation) et sont enrichies en intégrines, sélectines et en ligands CD40. Dans le cas des phagocytes du système nerveux central, la formation et la libération des microparticules nécessitent l'action d'un complexe enzymatique (aminophospholipides, translocase, scramblase flippase, floppase et calpaïne) et la mobilisation de la sphingomyélinase acide (A-SMAse). Ce complexe induit des modifications dans la symétrie des phospholipides membranaires, ce qui aboutit au bourgeonnement (Al-Nedawi, Meehan *et al.* 2009; Al-Nedawi, Meehan *et al.* 2009).

Le terme de « microvésicules » désigne dans de nombreuses publications l'ensemble des vésicules sécrétées par les cellules : exosomes, corps apoptotiques et microparticules ou ectosomes ; dans d'autres publications, ce terme regroupe les microparticules et les exosomes (Skog, Wurdinger *et al.* 2008; Cocucci, Racchetti *et al.* 2009).

### Les corps apoptotiques :

Ce sont des vésicules de 50 à 500nm, hétérogènes, riches en histones et qui contiennent des fragments d'ADN. Ils proviennent de la fragmentation des cellules lors de l'apoptose (Thery, Ostrowski *et al.* 2009).

### Les exosomes :

Les exosomes sont produits à partir de structures caractéristiques du compartiment endosomal tardif appelées « corps multivésiculaires ». Ils ont une taille comprise entre 40 et 100nm. Ils sont enrichis en certaines protéines, notamment des protéines du compartiment endosomal tardif telle que la tétraspanine CD63. En outre, leur membrane contient d'une part des glycérolipides ainsi que des radeaux lipidiques enrichis en cholestérol, sphingolipides et céramides (Simons and Raposo 2009). Pour isoler les exosomes, on tire parti de leur densité qui permet de les faire flotter sur un gradient de sucrose à une densité comprise entre 1,13 et 1,19 g/ml.

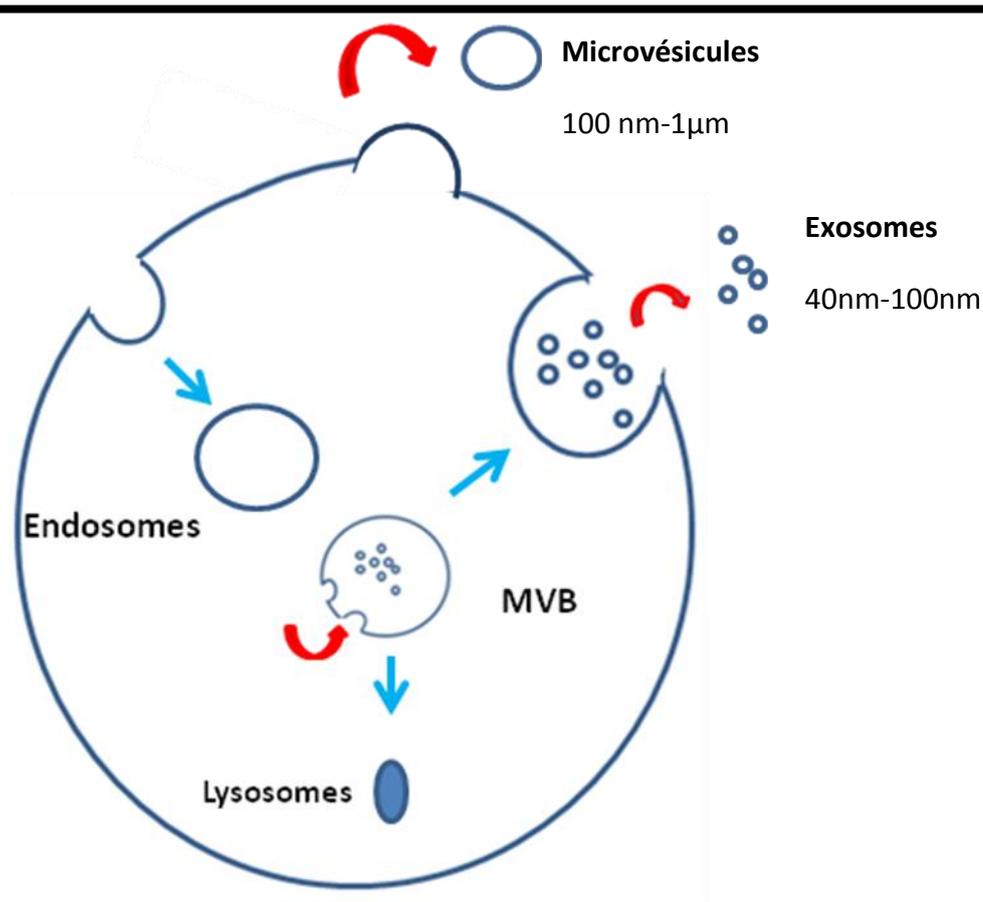
Les techniques de purification des différentes vésicules sécrétées qui sont variables d'une équipe à l'autre permettent généralement un isolement en fonction de leur taille et de leur densité mais pas de leur origine. En conséquence, en fonction des techniques de purification et du contrôle de la qualité des préparations, un mélange contenant des proportions variables des différents types de vésicules est fréquemment obtenu et la réalité de ce qui est décrit en tant qu'exosomes ou

microvésicules varie sans doute beaucoup d'une publication à l'autre (Cocucci, Racchetti *et al.* 2009; Simons and Raposo 2009).

Une équipe : l'équipe de Gould a qualifié d'exosomes des vésicules ayant certes des caractéristiques moléculaires propres aux exosomes mais produites selon un mode totalement différent. Ces vésicules décrites uniquement dans les cellules Jurkat (lymphocytes T immortalisés) en tant qu'« exosomes » sont produites directement par bourgeonnement de la membrane plasmique dans des régions membranaires riches en protéines caractéristiques des exosomes et non pas à partir des endosomes. Ces vésicules correspondraient donc plutôt du point de vue de leur biogenèse à des microvésicules (Booth, Fang *et al.* 2006).

#### 4.1.b Formation des exosomes :

Les exosomes sont formés à partir des endosomes tardifs (**Figure 8**). La membrane des endosomes peut s'invaginer, ce qui conduit à la formation de vésicules dites vésicules intra-luminales ou ILV au sein même des endosomes. Ceux-ci augmentent de taille en même temps qu'ils se remplissent d'ILV et deviennent alors des corps multi-vésiculaires (ou « multivesicular bodies », MVB). Les corps multi-vésiculaires ont été découverts par observation des cellules en microscopie électronique. Au moment de leur découverte, le seul devenir envisagé pour ces organites était de fusionner avec les lysosomes ; la fusion entraînant alors la dégradation de leur contenu. Mais il a ensuite été démontré, grâce à des études sur des réticulocytes de mouton, que la membrane des corps multi-vésiculaires peut fusionner avec la membrane des cellules et libérer les vésicules contenues à l'intérieur dans le milieu extra-cellulaire. Ce sont ces vésicules sécrétées qui sont qualifiées d'exosomes (Harding, Heuser *et al.* 1983; Pan, Teng *et al.* 1985) .



**Figure 8 : Formation des exosomes à partir du compartiment endosomal tardif et des microvésicules par bourgeonnement de la membrane plasmique.**

La membrane des endosomes tardifs s'invagine et des vésicules sont alors formées à l'intérieur des endosomes qui deviennent des corps multi-vésiculaires (MVB). Ces MVB peuvent ensuite fusionner avec les lysosomes ce qui entraîne alors la dégradation de leur contenu. La membrane des MVB peut aussi fusionner avec la membrane plasmique des cellules. Les vésicules intra-luminales (exosomes) sont alors libérées dans le milieu extra-cellulaire.

Les microvésicules sont formées directement par invagination de la membrane plasmique.

La libération d'exosomes peut être régulée par différents signaux intra-cellulaires. Ainsi, l'activation de la protéine p53 suite à l'irradiation des cellules induit une augmentation de la production d'exosomes (Yu, Harris *et al.* 2006).

Diverses observations tendent à montrer qu'il existe plusieurs populations de corps multi-vésiculaires et différents types d'exosomes sécrétés par une même cellule. Ainsi, en microscopie électronique, la taille, l'apparence et la composition des vésicules présentes dans les MVB peut varier. De même, le récepteur EGF est retrouvé dans une sous-population de corps multi-vésiculaires mais pas dans tous (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

*4.1.c Composition protéique des exosomes : (Simpson, Jensen et al. 2008) (Raposo, Nijman et al. 1996).*

La composition protéique des exosomes a été déterminée à partir de l'analyse d'exosomes de différents types cellulaires (lymphocytes B, cellules dendritiques, neurones et cellules de Schwann) par analyse protéomique, western-blot, immuno-histochimie et microscopie électronique, cytométrie de flux (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

Les résultats des différentes études montrent que les exosomes contiennent des protéines responsables de l'adhésion cellulaire telles que les intégrines, les tétraspanines, la protéine MFGE8 (Milk Fat Globule-EGF factor 8 protein). D'autres protéines contenues dans les exosomes appartiennent à la famille des protéines impliquées dans le transport membranaire et le trafic cellulaire (famille des protéines rabGTPases et annexine) ainsi que des protéines du cytosquelette comme l'actine et les protéines ERM (ezrine, radixine, moesine) ou encore la myosine et la tubuline.

On retrouve aussi des protéines se liant aux récepteurs de mort (FasL, TRAIL) ainsi que des molécules impliquées dans l'apoptose (Alix, Tpx, galectine3). Ces nano-vésicules contiennent aussi des molécules intervenant dans les communications inter-cellulaires : des molécules du CMH I et II, des cytokines et des récepteurs des cytokines (TNF alpha, TNFR1, TGF-beta).

On peut aussi retrouver des protéines chaperones (Hsc70 et Hsp90), des facteurs de la traduction : facteurs d'élongation EIF-4A et EIF1alpha ainsi que des enzymes (pyruvate, enolase).

Compte-tenu de leur origine, il n'est pas surprenant de retrouver des protéines spécifiques des endosomes ou des lysosomes dans les exosomes: protéines du complexe ESCRT (Tsg101, Alix) , Lamp2, molécules du CMH, Mac-1, hsc73, hsp84, synténine, rabGTPase7, rab11, rap1B ainsi que plusieurs annexines (Thery, Boussac *et al.* 2001).

Les exosomes sont produits par de très nombreux types cellulaires : cellules hématopoïétiques : cellules dendritiques, mastocytes, lymphocytes B et T, plaquettes mais aussi par des cellules non-hématopoïétiques : cellules neuronales, cellules de Schwann et cellules épithéliales intestinales (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

Ils peuvent aussi être libérés par des cellules tumorales par exemple de mésothéliome, de mélanome, de carcinome ovarien (Simpson, Jensen *et al.* 2008) et même par des champignons

pathogènes unicellulaires tels que *Cryptococcus neoformans* (Silverman and Reiner 2011). En conséquence, le contenu protéique des exosomes est le reflet du protéome des cellules productrices ainsi que de leur état physiologique (transformation, irradiation, stress, stimulation etc) mais on y retrouve aussi des protéines communes à tout les exosomes (Simpson, Jensen *et al.* 2008).

Ainsi, certaines protéines sont présentes dans tous les exosomes quelque soit le type cellulaire : heat shock proteins (HSP70 et HSP90), tétraspanines (CD9, CD63, CD81 et CD82).

En revanche, certaines protéines ne sont retrouvées que dans les exosomes de certains types cellulaires : les lymphocytes B exportent dans les exosomes des molécules du CMH I et II et la protéine CD86, on retrouve la transferrine sur les exosomes de réticulocytes, le récepteur GluR2/3 à la surface des exosomes de neurones. Dans certains cancers, certains marqueurs spécifique des tumeurs sont présents dans les exosomes produits par les cellules tumorales par exemple l'éphrine B1 dans les exosomes de cellules de cancers colorectaux, la LMP1 dans les exosomes de lignées lymphoblastoïdes et de carcinomes naso-pharyngés (Dukers, Meij *et al.* 2000; Keryer-Bibens, Pioche-Durieu *et al.* 2006). La protéine HER-2 (Receptor tyrosine kinase erbB-2) est présente dans les exosomes de carcinomes ovariens et de carcinomes mammaires.

Les exosomes sont, en revanche, dépourvus de protéines du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie (Schorey and Bhatnagar 2008).

#### *4.1.d Mécanismes de l'incorporation sélective de protéines dans les exosomes :*

L'adressage des protéines vers les exosomes débute par une diffusion latérale des chargements protéiques ou cargos protéiques membranaires vers la membrane endosomale puis par la formation de vésicules par invagination de la membrane et la libération de vésicules dans la lumière des endosomes (Simons and Raposo 2009).

Les protéines du complexe ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) -0, I, II reconnaissent les protéines ubiquitinylées et les associent à la membrane des endosomes. Le complexe ESCRT-III serait à l'origine de l'invagination de la membrane et son rôle dans l'incorporation de protéines dans les MVB destinés à fusionner avec les lysosomes est avéré (Simons and Raposo 2009) mais son rôle réel dans l'adressage des protéines aux exosomes n'est pas encore élucidé. On note néanmoins un enrichissement en composants du complexes ESCRT et en protéines ubiquitinylées dans les exosomes (Simons and Raposo 2009). Le regroupement de protéines à la membrane des endosomes semble être un facteur important pour leur incorporation.

Certaines protéines pourraient être adressées aux exosomes sans la participation du complexe ESCRT et d'autres mécanismes ont été proposés. En effet, l'équipe de Simons (Hurley 2008) a montré que la formation des corps multi-vésiculaires destinés à la fusion avec la membrane plasmique dépendait des céramides par un mécanisme ESCRT indépendant. Dans ce modèle, il y aurait une translation des cargos protéiques le long de la membrane des endosomes vers des domaines enrichis en composants des radeaux lipidiques. Ces domaines contiendraient des sphingolipides transformés en céramides après action de sphingomyélinases (SMases) ce qui induirait alors une courbure de la membrane et la libération des vésicules dans les endosomes (Trajkovic, Hsu *et al.* 2008). De même, l'incorporation de la molécule pré-mélanosomale Pmel17 ne nécessite pas d'ubiquitinylation ni la présence des protéines Hrs (hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate) ou des composants du complexes ESCRT-I (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

La sortie des protéines cytosoliques dans les exosomes pourrait s'expliquer par une incorporation non spécifique de portions du cytosol. Certaines protéines sont retrouvées dans les exosomes car elles sont présentes dans les radeaux lipidiques et ont une affinité pour ces domaines : c'est le cas de la flotilline-1 (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

#### *4.1.e Composition des exosomes en acides nucléiques :*

Les exosomes contiennent divers acides nucléiques : des ARNm et des microARN. En 2007, l'équipe de Lötvall a montré que des exosomes de mastocytes contenaient des ARNm et des microARN dont le profil ne reflétait pas celui de la cellule productrice ce qui suggérait un enrichissement spécifiques en ARNm et microARN des exosomes (Valadi, Ekstrom *et al.* 2007). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Skog en 2008 qui a montré que 4700 ARNm ont été détectés exclusivement dans les exosomes de glioblastome et pas dans les cellules productrices. Lui aussi a noté une absence de corrélation entre la distribution des ARNm présents dans les exosomes et dans les cellules productrices confirmant l'incorporation spécifique de certains ARNm dans ces nano-vésicules (Skog, Wurdinger *et al.* 2008). La protéine ESCRTII pourrait être responsable de l'incorporation des ARN dans les exosomes : cette protéine est déjà impliquée dans l'exportation de cargos protéiques et certaines de ses sous-unités peuvent se lier aux ARNm (Irion and St Johnston 2007; Lee, D'Asti *et al.* 2011).

#### *4.1.f Composition lipidique des exosomes :*

Les exosomes isolés à partir de la plupart des types cellulaires contiennent de la lysophosphatidylcholine, de la sphingomyéline, de la phosphatidylcholine, de la phosphatidylsérine, phosphatidyléthanolamine, du cholestérol et des diglycérides. Néanmoins, les proportions des différents lipides peuvent varier et notamment le rapport entre le cholestérol et les phospholipides qui est par exemple plus élevé dans les exosomes issus de lymphocytes B que dans les exosomes dérivés de mastocytes ou de réticulocytes (Schorey and Bhatnagar 2008).

## 4.2. Fonctions des exosomes :

### *4.2.a Introduction*

Les exosomes étaient au départ considérés comme un moyen pour la cellule de se débarrasser d'éléments inutiles et en particulier de protéines membranaires obsolètes. La sécrétion d'exosomes par les réticulocytes induit effectivement une perte de protéines ainsi qu'une diminution de la surface membranaire indispensable à la différenciation de ces cellules (Johnstone 2006). Cependant, il est désormais prouvé que ces vésicules sont bien plus que des « poubelles cellulaires » : elles sont indispensables au fonctionnement cellulaire et jouent un rôle important dans les communications inter-cellulaires.

### *4.2.b Présentations d'antigènes :*

On observe en microscopie électronique une concentration des molécules du CMH II dans les compartiments endosomaux multi-vésiculaires des lymphocytes et la libération d'exosomes porteurs de molécules du CMH II dans le milieu extra-cellulaire (Raposo, Nijman *et al.* 1996). Les exosomes de cellules dendritiques et de lymphocytes B portent à leur surface des molécules du CMH I et II associées à des peptides ainsi que des molécules CD86. Ces exosomes peuvent alors présenter les antigènes aux cellules T. Ainsi, l'injection d'exosomes exposant à leur surface des antigènes tumoraux a permis la régression de tumeurs chez la souris (Zitvogel, Regnault *et al.* 1998). Un essai clinique utilisant cette stratégie est actuellement en cours à l'institut de Cancérologie Gustave Roussy.

Dans le cas des cellules épithéliales, des exosomes peuvent être sécrétés à la fois à partir de la zone apicale et baso-latérale. D'après Van Niel et ses collègues, ces deux types d'exosomes auraient

chacun une fonction spécifique : les exosomes libérées à la face apicale permettraient de se débarrasser de protéines inutiles et les exosomes libérés par la partie basale de la cellule permettraient de transmettre des antigènes pénétrant dans les cellules à la face apicale vers les cellules du système immunitaire présentes à proximité de la partie basale (van Niel, Raposo *et al.* 2001).

#### *4.2.c Modulation de la réponse immunitaire :*

Les exosomes libérés par les cellules infectées par *Mycobacterium tuberculosis* contiennent des composants microbiens qui modulent la réponse immunitaire notamment en induisant une réponse pro-inflammatoire des macrophages (Schorey and Bhatnagar 2008).

Notre équipe a montré que les cellules de NPC libèrent des exosomes porteurs de Galectine-9 qui peuvent être purifiés à partir du plasma de patients atteints de NPC ou de souris xénotreffées avec des lignées tumorales de NPC. Dans des expériences *in vitro*, ces exosomes porteurs de galectine 9 induisent l'apoptose de lymphocytes CD4+ spécifiques d'EBV grâce à la liaison de la galectine 9 avec le récepteur Tim-3 (Klibi, Niki *et al.* 2009).

La LMP1, la principale oncoprotéine du virus Epstein-Barr, est sécrétée dans les exosomes de lignées infectées par EBV or, dans des expériences *in vitro*, les exosomes porteurs de LMP1 recombinante induisent une inhibition de la prolifération des lymphocytes T et un effet cytotoxique sur les cellules NK ainsi que la libération d'IFN gamma après stimulation par des antigènes (Dukers, Meij *et al.* 2000). Ainsi, les cellules exprimant la LMP1 pourraient inhiber la réponse immunitaire dirigée contre les cellules infectées en sécrétant des exosomes porteurs de la LMP1 (Raposo, Nijman *et al.* 1996; Simpson, Jensen *et al.* 2008).

#### *4.2.d Transfert de virus et prions*

Diverses publications ont évoqué la possibilité pour certains agents infectieux tels que le prion ou le VIH d'utiliser les voies de formation et de sécrétion des exosomes comme des chevaux de Troie pour se transmettre. Le prion est en effet sécrété par les cellules dans les exosomes (Fevrier, Vilette *et al.* 2004; Fevrier, Vilette *et al.* 2005). Dans le cas de macrophages infectés par le VIH, il a été montré que les particules virales et les exosomes sont dans les deux cas formés à partir d'un processus en deux étapes : invagination de la membrane des endosomes puis libération des virus ou

des vésicules contenues par fusion de la membrane des endosomes avec la membrane plasmique des cellules. Néanmoins, lorsque le virus infecte les cellules T, la libération des particules virales se fait par bourgeonnement de la membrane plasmique des cellules (Booth, Fang *et al.* 2006).

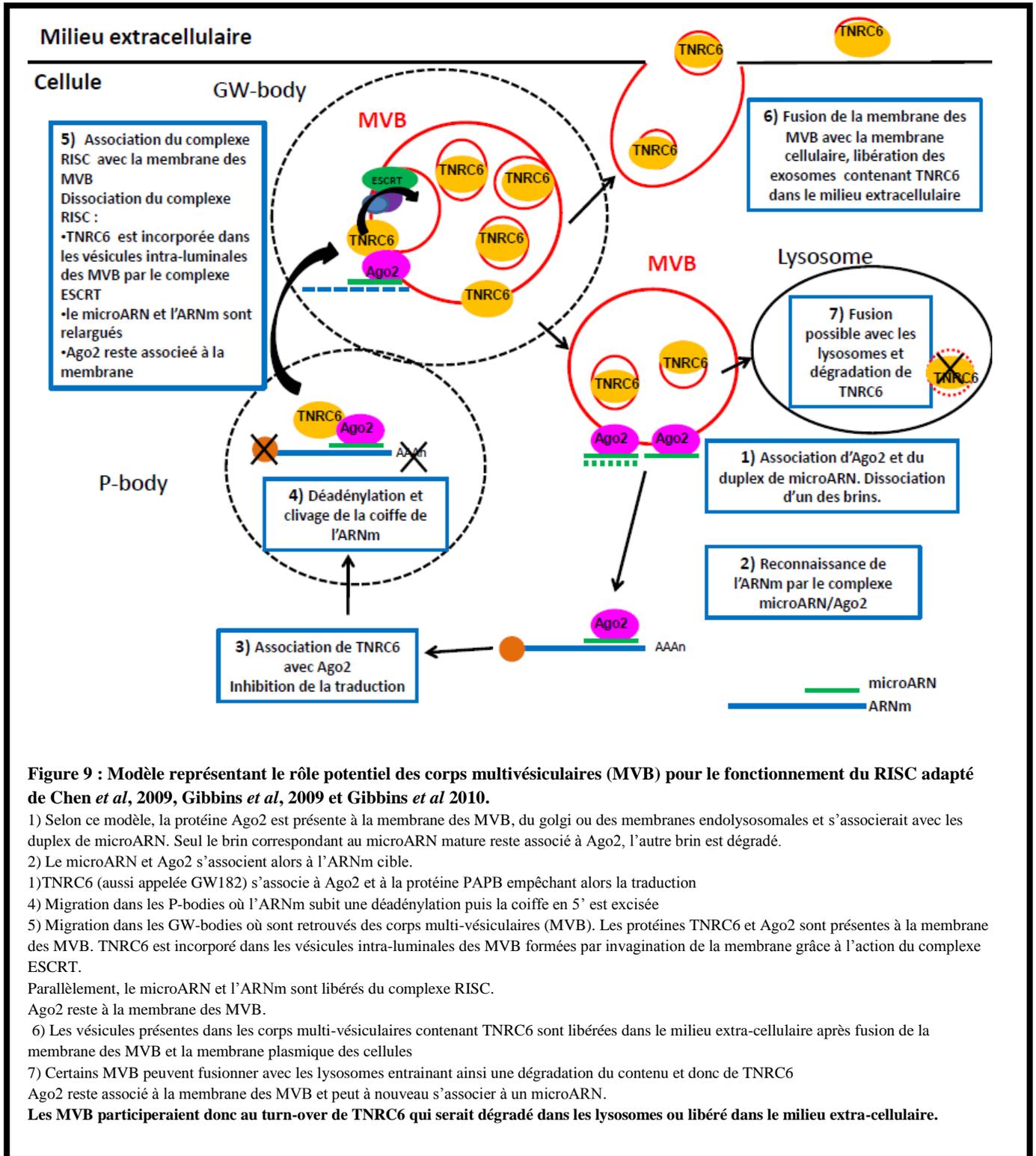
#### 4.2.e Transfert d'ARNm et de microARN :

De nombreuses études ont démontré que les exosomes et microvésicules pouvaient pénétrer dans des cellules receveuses. Dans la plupart des cas, les auteurs ont coloré les exosomes, généralement par le colorant des membranes PKH67, et ont détecté de la fluorescence dans les cellules receveuses (Skog, Wurdinger *et al.* 2008). Par conséquent, les acides nucléiques présents dans les exosomes peuvent être transférés de cellules donneuses vers des cellules receveuses par les exosomes. Les ARNm ainsi transférés sont fonctionnels et peuvent être traduits dans les cellules receveuses (Valadi, Ekstrom *et al.* 2007). Des exosomes purifiés à partir de surnageants de culture de cellules de glioblastome contiennent des ARNm, des microARN et peuvent être internalisés dans des cellules endothéliales (Skog, Wurdinger *et al.* 2008).

L'export de microARN dans les exosomes pourrait avoir de multiples fonctions. Ainsi, des cellules infectées par le virus Epstein-Barr sécrètent des exosomes contenant le microARN viral BHRF1-3 qui peut être transmis à des cellules receveuses dans des expériences de co-culture *in vitro*. Les microARN ainsi transmis induisent alors une répression de leur cible : la chimiokine CXCL11 attractant des lymphocytes T. En conséquence, les exosomes sécrétés par les cellules infectées pourraient, en pénétrant dans les cellules du voisinage, moduler la réponse immunitaire (Pegtel, Cosmopoulos *et al.* 2010).

L'association des microARN avec les exosomes n'est apparemment pas fortuite. Il semble, au contraire, qu'il y ait un lien fonctionnel étroit entre la formation des corps multi-vésiculaires et le fonctionnement du RISC ou RNA-induced silencing complex : le complexe protéique qui permet l'association des microARN et des ARNm cibles et empêche la traduction de l'ARNm cible (voir paragraphe précédent et **figure 4**). En effet, les protéines AGO2 et GW182 (TNRC6) : deux composants principaux du RISC sont associés à la membrane des endosomes et des corps multi-vésiculaires. De plus, GW182 et les microARN peuvent être retrouvés dans les exosomes. Si on inhibe des composants du complexe ESCRT, on induit une inhibition de l'action des microARN. Ces observations suggèrent que GW182 et certains microARN sont associés aux corps multi-vésiculaires et que leur sécrétion dans les exosomes ou leur dégradation dans les lysosomes est

nécessaire au bon fonctionnement du RISC (voir **figure 9**) (Chen, Zheng *et al.* 2009; Gibbings, Ciaudo *et al.* 2009; Gibbings and Voinnet 2010).



**Figure 9 : Modèle représentant le rôle potentiel des corps multivésiculaires (MVB) pour le fonctionnement du RISC adapté de Chen *et al*, 2009, Gibbins *et al*, 2009 et Gibbins *et al* 2010.**

- 1) Selon ce modèle, la protéine Ago2 est présente à la membrane des MVB, du golgi ou des membranes endolysosomales et s'associerait avec les duplex de microARN. Seul le brin correspondant au microARN mature reste associé à Ago2, l'autre brin est dégradé.
  - 2) Le microARN et Ago2 s'associent alors à l'ARNm cible.
  - 1)TNRC6 (aussi appelée GW182) s'associe à Ago2 et à la protéine PAPB empêchant alors la traduction
  - 4) Migration dans les P-bodies où l'ARNm subit une déadénylation puis la coiffe en 5' est excisée
  - 5) Migration dans les GW-bodies où sont retrouvés des corps multi-vésiculaires (MVB). Les protéines TNRC6 et Ago2 sont présentes à la membrane des MVB. TNRC6 est incorporé dans les vésicules intra-luminales des MVB formées par invagination de la membrane grâce à l'action du complexe ESCRT.
- Parallèlement, le microARN et l'ARNm sont libérés du complexe RISC.  
 Ago2 reste à la membrane des MVB.
- 6) Les vésicules présentes dans les corps multi-vésiculaires contenant TNRC6 sont libérées dans le milieu extra-cellulaire après fusion de la membrane des MVB et la membrane plasmique des cellules
  - 7) Certains MVB peuvent fusionner avec les lysosomes entraînant ainsi une dégradation du contenu et donc de TNRC6
- Ago2 reste associé à la membrane des MVB et peut à nouveau s'associer à un microARN.
- Les MVB participeraient donc au turn-over de TNRC6 qui serait dégradé dans les lysosomes ou libéré dans le milieu extra-cellulaire.**

#### 4.2.f Action oncogénique :

Les cellules tumorales sécrètent des microvésicules qui contiennent des molécules stimulant la coagulation, la croissance ou la transformation des autres cellules tumorales mais aussi des cellules du stroma tumoral : cellules endothéliales et cellules inflammatoires (Lee, D'Asti *et al.* 2011).

Les exosomes de glioblastome contiennent des protéines angiogéniques. Ces exosomes peuvent être internalisés par des cellules endothéliales micro-vasculaires cérébrales. Après internalisation, les exosomes stimulent la formation de tubules à partir des cellules endothéliales. De plus, ces exosomes produits par des cellules de glioblastomes peuvent stimuler de façon autocrine la prolifération de cellules de glioblastome (Skog, Wurdinger *et al.* 2008).

### 4.3. Interêt de l'étude des exosomes pour la recherche de marqueurs biologiques :

Les exosomes peuvent être isolés à partir de surnageants de cellules en culture mais aussi dans divers fluides biologiques tels que le sang, le plasma, le sérum, dans les liquides d'ascite, les urines, les épanchements séreux, le liquide synovial et les liquides récoltés après lavage broncho-alvéolaire (Pisitkun, Shen *et al.* 2004; Caby, Lankar *et al.* 2005) mais aussi dans la salive (Michael, Bajracharya *et al.*). La composition lipidique des exosomes ainsi que la présence à leur surface de molécules permettant de les protéger du complément (CD55 et CD59) participe sûrement à leur stabilité dans les liquides biologiques (van Niel, Porto-Carreiro *et al.* 2006).

Ces exosomes circulants pourraient se révéler particulièrement précieux pour déterminer, à distance, grâce à un prélèvement peu invasif, l'état des cellules productrices et en particulier des cellules tumorales dans le cas des cancers. La recherche de marqueurs à partir des exosomes pourrait peut-être à terme épargner à certains patients des biopsies répétées et permettre de connaître les caractéristiques moléculaires des tumeurs pour affiner le traitement ou le pronostic (Al-Nedawi, Meehan *et al.* 2009).

L'aquaporine-2 est détectée dans les exosomes présents dans l'urine de patients atteints de diabète insipide (Pisitkun, Shen *et al.* 2004)

Le récepteur EGFRvIII ainsi que des ARNm variants ou mutants et des microARN spécifiques de glioblastome ont ainsi pu être détectés dans les exosomes du sérum de plusieurs patients atteints par cette tumeur. De plus, chez ces mêmes patients, on peut détecter un enrichissement des exosomes en miR-21 : un microARN fréquemment surexprimé dans les tumeurs (Skog, Wurdinger *et al.* 2008).

Dans le cas des carcinomes ovariens, des exosomes provenant de la tumeur peuvent être détectés dans le sérum de patientes et le profil des microARN présents dans ces exosomes circulants correspond à celui observé dans les cellules tumorales. De plus, le profil des microARN des exosomes circulants originaires de la tumeur est significativement différents du profil observé chez les patientes atteintes de lésions ovariennes bénignes, ce qui pourrait ainsi permettre de discriminer les lésions bénignes des tumeurs malignes (Taylor and Gercel-Taylor 2008).

Cependant, plusieurs articles récents indiquent qu'une grande partie des microARN circulants ne sont sans doute pas contenus dans les exosomes. Ainsi Arroyo *et al* ont montré qu'après fractionnement du plasma par chromatographie une partie non négligeable des microARN ne sont pas élués dans les fractions contenant les exosomes. Ils sont, en revanche, co-élués avec la protéine Ago2, composant du complexe RISC. De plus, il est possible d'immunoprécipiter des microARN du plasma en utilisant des billes couplées avec des anticorps anti-Ago2 (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011). Ces résultats ont été confirmés par ceux de Turchinovich *et al* . Les auteurs ont purifié les exosomes de plasma par ultra-centrifugation et se sont aperçus que la majorité des microARN plasmatiques n'étaient pas dans le culot d'exosomes mais restaient dans le surnageant. Ils ont aussi démontré qu'une majorité de microARN est associée à la protéine Ago2 (Turchinovich, Weiz *et al.* 2011) . Ces résultats sont évoqués en détail dans la discussion de la deuxième partie des résultats et dans la discussion générale.

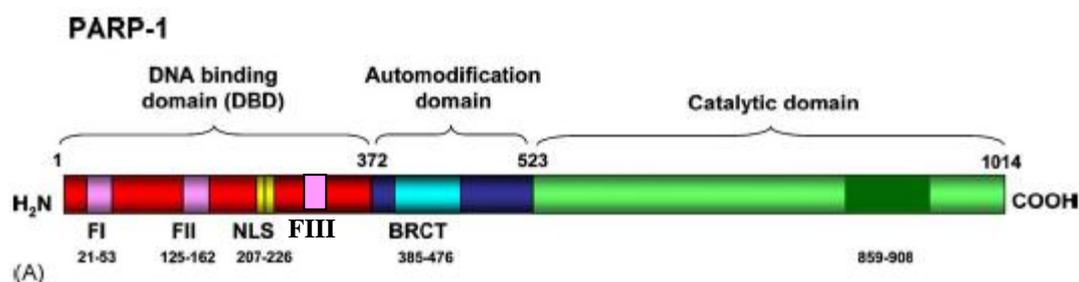
## 5) Généralités sur la PARP-1

La PARP1 appartient à la famille des poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) découvertes il y a plus de 45 ans (Chambon, Weill *et al.* 1963). Ces enzymes catalysent la formation de polymères de poly(ADP-ribose) sur des protéines cibles. Cette poly(ADP-ribosyl)ation est réversible et nécessite la présence de NAD<sup>+</sup> qui est clivé en ADP-ribose et nicotinamide. Il existe 18 protéines PARP qui catalysent la formation de polymères d'ADP-ribose mais la PARP la plus active est la PARP1. Les polymères d'ADP-ribose ne peuvent être synthétisés que par les protéines PARP (Bouchard, Rouleau *et al.* 2003; Heitz, Harter *et al.* 2010). La PARP1 est une protéine exclusivement nucléaire, ubiquitaire et très abondante (1 à 2 millions de copies par cellule) (Kraus 2008).

L'activité de la PARP1 est régulée par de multiples voies de signalisation cellulaire et peut être activée par des facteurs internes (vitamines, kinases) ou externes (hormones, cytokines) (Kraus 2008).

### 5.1 Structure

La PARP1 est une protéine de 113kDa qui comprend trois domaines en doigt de zinc qui ont une affinité particulièrement importante pour certaines formes d'ADN (cassures) (Kraus 2008) et permettent la liaison de la PARP1 sur l'ADN (Heitz, Harter *et al.* 2010). La PARP1 comporte un domaine catalytique en C-terminal qui est responsable du clivage du NAD, de l'accrochage de polymères de molécules d'ADP-ribose synthétisés à partir du NAD<sup>+</sup> sur de multiples protéines y compris elle-même. La région centrale de la protéine comporte un domaine d'auto-modification sur lequel se produisent des modifications covalentes qui changent les interactions de la PARP1 avec d'autres protéines partenaires (Kraus 2008). PARP-1 contient, de plus, une séquence de localisation nucléaire (NLS) (**figure 10**). Il existe une forme clivée de 89 kDa produite en cas d'apoptose et une forme courte de 55kDa provenant probablement d'un épissage alternatif ne contenant que le domaine catalytique de la PARP1 (Bouchard, Rouleau *et al.* 2003).



**Figure 10 : Structure de la PARP1**

PARP1 comprend 3 domaines en doigt de zinc permettant la liaison à l'ADN (FI, FII et FIII), un domaine de localisation nucléaire (NLS : Nuclear localization Signal), un domaine d'auto-modification et un domaine catalytique en C-terminal. D'après (Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005) ; (Langelier, Ruhl *et al.*)

## 5.2 Fonctions

Les fonctions de la PARP1 sont liées à sa capacité à s'associer à l'ADN, à son activité de synthèse de polymères d'ADP-ribose et à son association avec diverses protéines.

Dans le noyau, l'enzyme NMNAT-1 (nicotinamide mononucléotide adenylyltransferase-1) induit la production de NAD<sup>+</sup>, substrat de la PARP1, et peut aussi stimuler directement la PARP1. En présence de NAD<sup>+</sup> et après activation, la PARP1 catalyse l'accrochage de polymères d'ADP-ribose sur un résidu carboxylate, généralement un résidu glutamate mais aussi sur des résidus acide aspartique et lysine. Ces polymères peuvent être rapidement dégradés par l'enzyme PARG (poly(ADP-ribose) glycohydrolase) (Masutani, Nakagama *et al.* 2005; Heitz, Harter *et al.* 2010).

De nombreuses cibles de la PARP1 ont été identifiées, ce sont surtout des protéines qui se lient à l'ADN et qui sont impliquées dans des fonctions nucléaires : modification de la structure de la chromatine (topoisomérases, histones), modulation de la transcription et de la réplication (ARN et ADN polymérases), facteurs de transcription (Fos et NF-κB) ainsi que des protéines contrôlant le cycle cellulaire (p53) et des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN. Les polymères d'ADP-ribose sont chargés négativement, cette poly(ADP-ribosyl)ation induit sûrement une diminution de l'affinité de ces protéines pour l'ADN, altérant aussi leur activité. Cependant, la cible principale est PARP-1 elle-même. La PARP1 poly(ADP-ribosyl)ée devient chargée négativement et

perd sa capacité à se lier à l'ADN et aux nucléosomes. Elle devient alors inactive (Bouchard, Rouleau *et al.* 2003; Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005; Kraus 2008).

Récemment, un nouveau modèle d'activation et d'inactivation de la PARP1 a été proposé à partir d'études faites chez la drosophile : la PARP1 non poly(ADP-ribosyl)ée serait associée à la chromatine, elle serait un constituant habituel de celle-ci. Après activation de la PARP1 et sa poly(ADP-ribosyl)ation, cette protéine se décrocherait de la chromatine et serait alors relocalisée dans les corps de Cajal en association avec des protéines spécifiques de cet organite : la fibrillarine et la coiline. Après l'action de la PARG et le décrochage des polymères de poly(ADP-ribose) de la PARP1 celle-ci retournerait alors s'accrocher à la chromatine (Kotova, Jarnik *et al.* 2009). Ce mécanisme pourrait permettre l'adressage de protéines vers les corps de Cajal après leur association avec les polymères d'ADP-ribose branchés sur la PARP1.

#### *5.2.a : Rôles de la PARP1 dans la réparation de l'ADN :*

Plusieurs publications ont montré que la PARP1 joue un rôle dans la réparation de l'ADN : la réparation des cassures simples brin et la cytotoxicité sont diminuées si des cellules sont traitées par le 3-aminobenzamide, un inhibiteur compétitif de PARP ou en absence de NAD<sup>+</sup> (Durkacz, Omidiji *et al.* 1980). Des souris PARP1<sup>-/-</sup> sont plus sensibles à l'instabilité génétique après exposition à des agents génotoxiques (Meyer, Muller *et al.* 2000; Shall and de Murcia 2000; Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005). Suite à un dommage de l'ADN (cassures double brin ou simple brin), les quantités de poly(ADP-ribose), très faibles à l'état basal, augmentent fortement et passent de 0.52 pmol/mg d'ADN à 60 pmol/mg d'ADN (Bouchard, Rouleau *et al.* 2003) et la PARP1 est responsable de 90% de cette poly(ADPribosyl)ation cellulaire (Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005).

La PARP1 intervient dans la voie SSBR/BER (single-strand break repair/base excision repair). Elle reconnaît les dommages de l'ADN grâce à ses domaines en doigts de zinc et son activité catalytique augmente alors fortement. Après activation, la PARP1 module l'activité de diverses protéines responsables de la structure de la chromatine, du métabolisme et de la réparation de l'ADN soit en interagissant directement avec ces protéines ou par leur poly(ADP-ribosyl)ation (Schreiber, Dantzer *et al.* 2006). La PARP1 interagit notamment avec les protéines XRCC1 et l'ADN polymérase  $\beta$  (Dantzer, de La Rubia *et al.* 2000). La PARP1 et différentes cibles comme les histones sont poly(ADPribosyl)ées ce qui induit une décompaction de la chromatine et facilite ainsi l'accès des enzymes de réparation au site de cassure (Heitz, Harter *et al.* 2010).

Si les dommages de l'ADN sont très importants, de très nombreux polymères d'ADP-ribose sont synthétisés ce qui aboutit à la mort cellulaire (Bouchard, Rouleau *et al.* 2003).

La PARP1 ne semble pas indispensable à la réparation des cassures double-brin mais il a récemment été publié que des souris PARP1<sup>-/-</sup> et PARP3<sup>-/-</sup> sont plus sensibles aux radiations ionisantes, les protéines PARP1 et PARP3 auraient ainsi un effet synergique dans la réparation des cassures double-brins (Schreiber, Dantzer *et al.* 2006; Boehler, Gauthier *et al.* 2011). D'après Qiao Cheng et ses collègues, PARP1 jouerait un rôle dans des voies alternatives de réparation de cassures double-brin en particulier dans des cellules n'exprimant pas la protéine Ku70 (Cheng, Barboule *et al.* 2011).

#### *5.2.b : PARP1 et stabilité des centromères :*

PARP-1 s'associe aux centromères actifs en métaphase où elle pourrait réguler l'activité de certaines protéines associées aux centromères par poly(ADP-ribosyl)ation (Earle, Saxena *et al.* 2000). PARP-1 et PARP-3 régulent la duplication des centrosomes et la formation du fuseau mitotique (Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005). Les travaux de Saxena et ses collègues en 2002 ont montré que PARP-1 interagit avec des protéines associées aux centromères transitoirement (BUB3) ou constitutivement (CENP-A et CENP-B) et que ces protéines sont polyADP-ribosylées suite à des dommages de l'ADN après une irradiation. Ce processus joue un rôle dans la maintenance de l'hétérochromatine précentrique. Néanmoins, chez des souris PARP1<sup>-/-</sup>, aucune anomalie des centromères n'est observée, ce qui suggère que le rôle de la PARP1 dans l'organisation des centromères peut être suppléé par d'autres protéines (Saxena, Saffery *et al.* 2002).

#### *5.2.c : PARP1 et contrôle de la transcription :*

Selon divers auteurs, la PARP1 peut activer ou inhiber la transcription par différents mécanismes.

Ainsi, diverses études montrent que l'association de PARP1 sur la chromatine et plus particulièrement avec les histones H3 et H4 *in vitro* mais aussi *in vivo* induit la compaction de la chromatine associée à l'inhibition de la transcription. L'addition de polymères d'ADP-ribose aboutit au relâchement de la chromatine et facilite la transcription par la polymérase II (Ji and Tulin 2010).

Par ailleurs, la localisation de PARP1 sur le génome a été étudiée par immuno-précipitation de la chromatine suivie par hybridation sur puces d'ADN génomique. Dans les cellules MCF-7, 90% de

la PARP1 est localisée sur les promoteurs de gènes transcriptionnellement actifs (Kraus 2008). Des études sur des souris Parp 1<sup>-/-</sup> ont montré que la perte de PARP1 induit des modifications du transcriptome. La PARP1 régule environ 3,5% des transcrits principalement par activation transcriptionnelle (Ogino, Nozaki *et al.* 2007). Les gènes cibles jouent un rôle dans le métabolisme, le cycle cellulaire, la réponse au stress et la transcription (Wang, Auer *et al.* 1995; Kraus 2008).

PARP-1 peut aussi se lier à des facteurs de transcription (NF- $\kappa$ B, HES1, HTLV Tax-1, Sp1, NFAT) et agir en tant que co-activateur ou co-répresseur (Kraus 2008).

#### *5.2.d : Rôle de la PARP1 dans l'apoptose :*

La PARP1 joue un rôle dans l'apoptose. Elle peut par exemple induire la mort de neurones par auto-ribosylation et clivage suivi de la translocation dans le noyau du facteur AIF (apoptosis-inducing factor) qui joue un rôle dans l'activation de l'apoptose caspase-indépendante (fragmentation de l'ADN) et caspase dépendante (activation de la cascade des caspases) (Koh, Dawson *et al.* 2005; Kannan, Fang *et al.* 2011).

Par ailleurs, lors de l'apoptose, les caspases induisent le clivage de la PARP. La détection de la PARP1 clivée est une méthode de détection de l'apoptose couramment utilisée.

L'inhibition de l'activité de la PARG peut conduire à l'arrêt de la croissance et à la mort cellulaire (Koh, Dawson *et al.* 2005).

#### *5.2.e : Rôle dans l'oncogenèse :*

La PARP1, en participant aux processus de réparation de l'ADN et de mort programmée, intervient dans la prévention des processus tumoraux et retarde le vieillissement (Meyer-Ficca, Meyer *et al.* 2005). Une altération ou une inhibition de l'expression ou de l'activité de la PARP1 est observée dans divers cancers. Dans des modèles de souris transgéniques comportant des délétions de l'exon 2 ou 4 de la PARP1, on observe une incidence modifiée de certains cancers et leur croissance peut être accélérée. Ainsi des souris PARP<sup>-/-</sup> (délétion de l'exon 2) développent plus fréquemment des carcinomes hépato-cellulaires. Dans certains cas, la PARP1 pourrait au contraire favoriser le développement de tumeurs : la surexpression de la PARP1 dans les cancers ovariens séreux est associée à un mauvais pronostic.

La PARP1 peut donc favoriser ou inhiber le développement des tumeurs en fonction du contexte cellulaire et des séquences du gène de la PARP1 délétées.

### 5.2.f: Rôle de PARP1 dans le cycle viral de différents virus :

Ces dernières années, plusieurs études ont montré que la PARP1 pourrait avoir un rôle important dans le cycle de plusieurs virus dont EBV en régulant la transcription et/ou la réplication du génome viral.

#### -rôle pour la décapsidation de l'adénovirus :

La poly(ADP-ribosyl)ation des protéines de capsidie semble nécessaire au désassemblage des particules d'adénovirus, le traitement par des inhibiteurs de poly(ADP-ribosylation) entraînant une forte diminution de l'infectivité (Dery, de Murcia *et al.* 1986).

#### -rôle dans la transcription du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) :

La transcription des gènes du VIH est déclenchée par fixation du complexe Tat/PTEFb (positive transcription elongation factor b) sur la région Tar : une séquence d'ARN synthétisée à partir des séquences terminales répétées (LTR : long terminal repeats) du génome viral. Or, PARP1 peut se lier à la région Tar, bloquer par compétition la fixation du complexe Tat/PTEFb et empêcher ainsi la trans-activation de la transcription (Parent, Yung *et al.* 2005). D'autre part, la protéine virale vpr, en complexe avec le récepteur des glucocorticoïdes, s'associe avec la PARP1, séquestrant cette dernière dans le cytoplasme, ce qui, d'après les auteurs, a pour conséquence d'inhiber l'action de NF- $\kappa$ B associé avec la PARP1 en le retenant dans le cytoplasme. L'inhibition de l'action de NF- $\kappa$ B pourrait aboutir à une diminution de la réponse immunitaire contre les cellules infectées. La relocalisation de PARP1 dans le cytoplasme pourrait aussi empêcher son association avec l'ARN Tar permettant ainsi la liaison de Tat/PTEFb avec Tar et induisant alors la transcription des gènes viraux (Muthumani, Choo *et al.* 2006).

#### - rôle dans la transcription du virus HTLV:

PARP1 est un co-activateur du facteur de transcription Tax du virus HTLV (Human T leukemia Virus) et peut s'associer à la région TXREs (Tax responsive elements) qui sont des sites de liaison pour Tax. PARP1 participe donc à l'activation de la transcription virale (Zhang, Hildebrandt *et al.* 2002).

#### - Rôle dans l'inhibition de la réplication du virus KSHV:

PARP1 s'associe avec les séquences terminales répétées (LTR) du virus du sarcome de Kaposi (KSHV) qui constituent l'origine de réplication du virus. Suite à cette association avec les LTR, la PARP1 est responsable de la poly(ADP-ribosyl)ation de la protéine virale LANA. Or cette protéine accrochée aux LTR est indispensable pour la réplication du génome viral au cours de l'infection latente.

Une augmentation de l'activité de la PARP1 après traitement par l'hydroxyurée entraîne une diminution du nombre de copies du génome viral par cellule. En revanche, si on traite les cellules par du niacinamide ou du 3-aminobenzamide qui induisent une diminution de l'activité de la PARP1, le nombre de copies augmente. Là encore, PARP1 joue donc un rôle dans la réplication du génome viral (Ohsaki, Ueda *et al.* 2004).

#### -Rôle dans la régulation de la réplication du virus Epstein-Barr :

La réplication du génome d'EBV nécessite la fixation de la protéine EBNA1 sur deux sites de liaison (DS) présents sur l'OriP : origine de réplication du génome viral. Ces sites sont situés à proximité de sites de liaison au TRF (Telomere repeat factor) qui est indispensable à la réplication du génome viral. Dans des lymphocytes B infectés de façon latente par EBV, PARP1 s'associe à l'origine de réplication OriP induisant l'accrochage de polymères d'ADP-ribose sur la protéine virale EBNA1, ce qui réduit son affinité pour l'ADN viral et empêche le recrutement du complexe ORC (origin recognition complex). Ces résultats suggèrent donc que PARP1 régule la réplication virale (Tempera, Deng *et al.* 2010).

## **Deuxième partie : Résultats**

1) Premier manuscrit publié :

**Libération extra-cellulaire de micro-ARN viraux : rôles des exosomes et autres transporteurs**

# **Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells.**

**Article publié dans Virology Journal**

C. Gourzones, A.Gelin, I.Bombik, J. Klibi, B. Vérillaud, J. Guigay, P.Lang, S.Temam, V. Schneider, C. Amiel, S. Baconnais, A.S. Jimenez, P. Busson.

## 1.1. Introduction à la problématique de l'article :

Les NPC sont des tumeurs qui se développent dans la partie profonde du massif facial, ce qui rend leur dépistage difficile. Elles ne sont pas directement visibles à l'examen clinique et les symptômes ressentis par le malade sont souvent indirects : douleurs de localisation trompeuse, troubles de l'audition, saignements de nez. Il est donc très important d'obtenir des outils biologiques pour faciliter le dépistage précoce en identifiant les individus à risque.

Fait remarquable, dès la fin des années 1970, très tôt après la découverte de l'association EBV-NPC, on a pu croire que la sérologie EBV allait fournir des outils de dépistage appropriés. En effet, on sait depuis cette époque qu'une augmentation du taux des IgA dirigées contre plusieurs protéines d'EBV précède le développement d'une tumeur macroscopiquement visible. La majorité des études ont porté sur les anticorps circulants dirigés contre des protéines précoces d'EBV (EA) et des protéines de capsides (VCA). La détection des IgA anti-Ea et anti-VCA est un test sensible dans la mesure où elle génère peu de faux négatifs. Tous les sujets à risque sont englobés dans le groupe des sujets avec anti-EA et -VCA élevés. En revanche, ces tests sont peu spécifiques. Dans les zones d'endémie, notamment en Chine du Sud, environ 3 % des adultes présentent des taux d'IgA anti-EA et VCA élevés. Toutefois, seule une petite proportion d'entre eux se trouvera effectivement atteinte d'un NPC qui se développera le plus souvent dans les deux ou trois ans. Ce manque de spécificité est un obstacle majeur pour la mise en place des politiques de dépistage car le nombre de patients qui doivent subir des examens fibroscopiques du nasopharynx répétés et éventuellement accompagnés de biopsies est très grand par rapport au nombre de NPC réellement dépistés. Cela est générateur de dépenses élevées et de beaucoup d'inquiétudes inutiles dans la population soumise au dépistage. D'où l'importance de mettre au point d'autres outils biologiques.

Beaucoup de travaux ont été effectués concernant l'ADN circulants d'EBV. Celui-ci est détecté par PCR en temps réel soit dans l'ADN extrait du sang total (ADN plasmatique plus ADN cellulaire) soit dans l'ADN plasmatique. Malheureusement, la détection de l'ADN viral circulant est plus utile pour la surveillance des patients traités que pour le dépistage car il y a un recouvrement entre un nombre de copies d'ADN d'EBV relativement élevé chez certains porteurs sains sans risque particulier de NPC et des valeurs parfois faibles chez des sujets porteurs de NPC volumineux. Il est donc difficile d'établir un seuil d'alerte pour le niveau d'ADN viral circulant.

Lorsque j'ai débuté cette étude en 2009, l'équipe d'accueil avait démontré que chez des patients porteurs de NPC les exosomes tumoraux de NPC pouvaient diffuser du milieu tumoral vers la circulation et être isolés à partir d'échantillons de plasma. D'autres équipes avaient montré que les microARN d'EBV du cluster BHRF1 pouvaient être véhiculés par les exosomes provenant de lymphocytes B transformés *in vitro* par EBV. En outre, nous savions que les microARN de la famille BART sont très abondants dans les NPC. Nous avons donc fait les hypothèses suivantes : 1) sécrétion d'exosomes porteurs de microARN BART par les cellules de NPC *in vitro* et *in vivo* ; 2) diffusion de ces exosomes dans le plasma des souris xéno greffées avec des lignées tumorales de NPC (C15, C17 et C666-1) et dans le plasma des patients porteurs de NPC ; 3) possibilité de détecter les microARN BART par PCR en temps réel dans des échantillons de plasma provenant de souris xéno greffées ou de patients porteurs de NPC.

Après avoir validé nos réactifs en analysant les microARN BART dans des extraits de tumeurs C15, C17 et C666-1, nous avons isolé les exosomes produits par les cellules de NPC *in vitro* (culture à court terme *ex vivo* pour les lignées C15 et C17) et montré que ces exosomes contiennent effectivement des microARN BART (figures 1, 2 et 3). Ensuite, nous avons détecté les miR-BART dans des échantillons de plasma provenant de souris xéno greffées avec des lignées tumorales de NPC en prenant comme contrôles des souris xéno greffées avec une tumeur épithéliale non-NPC. Compte tenu d'une compétition possible avec d'autres équipes, dans le cadre de ce premier travail, la détection des microARN BART a été pratiquée sur des échantillons de plasma bruts sans isolement préalable des exosomes. Le modèle des NPC xéno greffés est très favorable pour ce type d'expérience puisque même des tumeurs d'un volume acceptable représentent facilement 5 à 8% du poids de la souris, ce qui permet d'atteindre des concentrations élevées de microARN d'origine tumorale dans le plasma des souris. Un autre facteur favorable a été la mise en évidence d'une concentration quasi-identique du miR-146a dans les différents pools de plasma provenant des souris porteuses des différentes xéno greffes. Ainsi miR-146a a pu être utilisé comme référence pour calculer la concentration relative des miR-BART.

Enfin, j'ai recherché les miR-BART dans des échantillons de plasma provenant de patients porteurs de NPC (5 donneurs), 2 patients porteurs de tumeurs non-NPC et 4 donneurs en bonne santé. De nouveau, dans cette petite collection d'échantillons de plasma humains, nous avons pu prendre miR-146a comme référence. En moyenne, la concentration de miR-BART7 était plus

élevée dans le plasma des malades NPC mais avec un seul patient sur les cinq ayant une valeur nettement plus élevée que pour les sujets contrôle.

**Au total, ce travail nous a permis de faire la preuve que les miR-BART peuvent diffuser de la tumeur vers le compartiment sanguin et qu'au moins chez certains patients NPC, ils peuvent être détectés à un taux élevé. Cependant, nous avons considéré ce travail comme n'étant qu'une première étape dans la mesure où nous apparaissait nécessaire de confirmer ces résultats sur un nombre plus important de patients et de contrôles. De plus, nous n'avons pas effectué de quantification absolue du nombre de copies des miR-BART ni mis en œuvre de contrôles de type spike-in (ajout, au moment de la purification d'ARN, d'un microARN synthétique mimant les séquences de microARN de *C.elegans*). La suite de ce travail est présentée dans le deuxième manuscrit en préparation.**

## 2) Deuxième manuscrit (en préparation) :

**Detection of Epstein-Barr virus microRNAs in plasma samples from NPC patients: enhanced detection by Ago2 immunoprecipitation.**

### 2.1 Introduction

Plusieurs publications rapportent la détection de microARN dans le plasma (Arroyo, Chevillet *et al.*; Kroh, Parkin *et al.*; Mitchell, Parkin *et al.* 2008). Chez les patients porteurs de tumeurs, la détection de microARN circulants provenant des cellules tumorales pourrait être particulièrement intéressante pour le diagnostic ou le suivi de la réponse au traitement. Néanmoins, de nombreuses difficultés techniques se posent : les microARN tumoraux qui parviennent jusque dans le plasma et le sérum sont certainement peu abondants et fortement dilués compte-tenu de la richesse du sang en microARN provenant de cellules non-tumorales. Cependant, il a été montré que chez les patients atteints de cancers des modifications du profil des microARN plasmatiques peuvent être observées (Jeong, Kim *et al.* 2011).

Plusieurs auteurs soutiennent que les microARN détectés dans les liquides biologiques, notamment dans le sang, sont véhiculés et protégés par les exosomes. Effectivement, plusieurs observations vont dans ce sens : les microARN sont très stables dans le plasma et peuvent résister à plusieurs heures de traitement par la RNase A ainsi qu'à des traitements par des détergents, ce qui suggère que les microARN circulants sont protégés par des vésicules lipidiques ou par des complexes protéiques (El-Hefnawy, Raja *et al.* 2004; Chen, Ba *et al.* 2008). Plusieurs publications suggèrent une association des microARN et des exosomes dans les liquides biologiques et en particulier l'étude de Taylor au cours de laquelle les exosomes tumoraux présents dans le sérum de patientes atteintes de carcinomes ovariens ont été purifiés par chromatographie d'exclusion puis par capture immunomagnétique à l'aide de billes magnétiques couplées à des anticorps anti-EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule), une glycoprotéine membranaire fortement exprimée dans différents carcinomes et en particulier dans les cellules de carcinomes ovariens (van der Gun, Melchers *et al.* 2010). Le profil des microARN présents dans les exosomes a ensuite été analysé sur des biopuces. Les auteurs ont ainsi pu montrer que le profil des microARN présents dans les exosomes tumoraux du sérum n'était pas significativement différent de celui retrouvé dans la tumeur (Taylor and Gercel-Taylor 2008). Les mêmes observations ont été reproduites en isolant dans le sérum des

exosomes provenant de tumeurs de poumon (Rabinowits, Gercel-Taylor *et al.* 2009). Ces expériences suggèrent qu'il est effectivement possible de purifier les microARN circulants provenant de la tumeur en purifiant les exosomes tumoraux puis en extrayant les microARN qu'ils contiennent.

Toutefois, les exosomes ne sont pas les seuls véhicules des microARN dans le sang. Un article récemment publié dans PNAS montre que lorsque différentes fractions du plasma sont séparées par chromatographie d'exclusion (encore appelé gel filtration), les microARN circulants peuvent être classés en deux groupes : un groupe élué très rapidement associé à des vésicules et un autre groupe élué tardivement en même temps que les protéines solubles sans association à des vésicules (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011). De plus, ces mêmes auteurs ont réussi à purifier ces microARN non-vésiculaires en réalisant une immunoprécipitation d'Ago2, une protéine du complexe RISC (RNA Induced Complex) qui est responsable de l'association des microARN et des ARNm cibles dans les cellules. En effet, lorsque un échantillon de plasma est incubé avec des billes couplées à un anticorps monoclonal anti-Ago2, plusieurs dizaines de microARN plasmatiques peuvent être co-précipités et détectés par RT-PCR. Si les auteurs traitent le plasma par des protéases, ils ne parviennent plus à immunoprécipiter les microARN avec Ago2 ce qui indique que certains microARN ne sont pas vésiculaires et sont associés à des complexes protéiques incluant Ago2 qui les protègent contre la dégradation.

Ces résultats font écho à une autre étude réalisée sur les microARN extra-cellulaires libérés dans le surnageant de culture. Une partie des microARN extra-cellulaires sont inclus dans les exosomes, une autre fraction n'est pas associée aux exosomes mais à des complexes protéiques non-vésiculaires incluant la NPM1 ou nucléophosmine 1 (Wang, Zhang *et al.* 2010). De plus, certains microARN plasmatiques sont associés à des lipoprotéines et notamment aux HDL (Vickers, Palmisano *et al.* 2011).

Au cours de notre première étude sur la détection de microARN dans le plasma, nous avons pu démontrer qu'un microARN viral spécifique de la tumeur était présent dans le plasma de patients atteints de NPC mais pas dans le plasma de sujets sains ou dans le plasma de patients atteints de tumeur non-NPC. Cependant, ce microARN viral était indétectable chez 4 des 5 patients que comprenait l'étude. De plus, la quantité de miR-BART7 détectée n'était vraiment abondante – plus de trois fois la valeur moyenne des contrôles - que chez un seul des patients testés. Ces résultats suggèrent que miR-BART7 n'est présent que chez un petit groupe de patients ou que la sensibilité de notre test est insuffisante. C'est pourquoi il nous a semblé nécessaire de répéter cette étude sur

un plus grand nombre de patients avec une quantification absolue des copies de microARN BART. Dans la même expérience, nous nous proposons d'essayer par diverses approches d'augmenter la sensibilité de la détection d'ebv-miR-BART7 dans le plasma.

Afin de calculer le nombre de copies d'ebv-miR-BART7 dans les échantillons de plasma, nous avons établi une courbe de calibration réalisée par dilutions successives d'un ARN synthétique (quantification absolue). Nous avons aussi modifié la méthode de normalisation de la PCR quantitative en temps réel en ajoutant, au moment de la purification d'ARN, un microARN synthétique mimant les séquences de microARN de *C.elegans* inexistantes chez l'homme (« spike-in ») et ceci afin de tenir compte des facteurs pouvant induire une dégradation de l'ARN lors des étapes de l'extraction.

Dans notre première publication, nous avons montré que les cellules malignes de NPC libèrent *in vitro* des exosomes contenant des microARN viraux. Il était donc logique d'envisager qu'ebv-miR-BART7 est véhiculé par des exosomes dans le plasma des malades porteurs de NPC. C'est pourquoi nous avons cherché à augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection de miR-BART7 en concentrant les exosomes du plasma.

## 2.2 Matériel et méthodes

### **Purification de l'ARN contenu dans le plasma brut ou dans différentes fractions plasmatiques**

Les ARN ont été purifiés en utilisant le kit miRVana PARIS (Ambion) et en respectant le protocole conseillé par le fabricant pour la purification d'ARN total dans les liquides biologiques. Juste avant la première étape de l'extraction – traitement par le mélange phénol/chloroforme acide - un ou parfois deux oligoribonucléotides synthétiques dont la séquence reproduit celle de microARN de *c.elegans* ont été ajoutés. Les deux ARN synthétiques utilisés correspondent aux deux microARN de *c.elegans* cel-miR-39 et cel-miR-52 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne). A la phase finale de l'extraction, l'ARN purifié a été élué dans 100µl d'eau RNase free.

Pour la détection de miR-BART7 dans les plasmas de patients, la purification est effectuée à partir de 300µl de plasma.

### **Détection des microARN par PCR quantitative en temps réel :**

Les microARN ont été détectés en utilisant le kit Taqman microRNA Assay d'Applied Biosystems. Le protocole utilisé est identique à celui décrit dans le premier article pour la reverse transcription et l'amplification par PCR. Néanmoins, la quantification n'est pas relative mais absolue en utilisant une gamme de dilution de petits ARN synthétiques dont la séquence correspond à celui du microARN mature détecté (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Allemagne).

Dans le cas de l'ARN immunoprécipité avec Ago2 : 5µl d'ARN - pour 11µl obtenus à partir de 500 µl de plasma ; voir ci-dessous - ont été utilisés pour la reverse transcription puis 1,33µl de cDNA pour la PCR.

### **Fractionnement des plasmas sur gradient de KBr**

La méthode correspond à celle décrite dans (Lesnik, Vonica *et al.* 1993)

Le fractionnement a été réalisé sur 2 à 3 ml de plasma.

La densité du plasma est augmentée jusqu'à 1,21g/ml par addition de KBr. Deux millilitres d'une solution de densité de 1,24g/ml sont déposés au fond du tube. Au dessus est ajouté le plasma à la densité de 1,21g/ml puis 2 ml de solution de KBr de densité 1,063g/ml, 2,5ml de densité 1,019 et enfin 2,5 ml de densité 1,006. Les solutions utilisées pour le gradient contiennent 0,01% de NaN<sub>3</sub>, 0,01% d'EDTA, 0,05% de gentamicine.

Le gradient est ensuite centrifugé pendant 44h à 40 000 rpm à 15°C dans un rotor SW41Ti. Vingt-neuf fractions de densité croissante sont recueillies et congelées.

### **Western-Blot anti-CD63 sur les fractions de plasma après fractionnement sur gradient de KBr**

Le dosage des protéines des différentes fractions a été réalisé en utilisant le kit Bradford (Biorad). La détection du CD63 sur les différentes fractions a été effectuée par western-blot à partir de 4µg de protéines de différentes fractions recueillies sur le gradient de KBr. Les gels utilisés sont des gels pré-coulés avec un gradient d'acrylamide (Pierce, Thermo Scientific, Brebières, France) et la migration s'effectue en conditions non-réductrices. Le protocole utilisé pour l'hybridation est identique à celui décrit dans le premier article.

### **Quantification de la charge virale dans le plasma**

Le nombre de copies du génome viral par millilitre de plasma a été quantifié en suivant le protocole décrit dans le premier article.

### **Immunoprécipitation d'Ago2 :**

Les microARN associés à Ago2 dans le plasma ont été immunoprécipités en utilisant les « microRNA isolation kits », version Human Ago2 ou version Mouse Ago2 vendus par Wako chemicals GmbH, Neuss, Germany et en suivant les instructions du producteur. Brièvement : 500µl de plasma ont été dilués au demi dans du PBS puis incubés avec des billes couplées à des anticorps anti-Ago2 humaine ou anti-Ago2 murine pendant 5 heures sous agitation sur roue à 4°C. Après 3 lavages des billes dans le tampon de lyse du kit et ajout de 50µl du tampon d'éluion, les microARN immunoprécipités avec Ago2 sont purifiés par extraction avec un mélange de phénol, chloroforme et d'alcool isoamylique (25 :24 :1) en respectant exactement les instructions du kit. Les culots d'ARN obtenus ont été resuspendus dans 11µl d'eau Rnase free.

## 2.3 Résultats

### **Une concentration élevée d'ebv-miR-BART7 est détectée chez certains patients atteints de NPC.**

Lors de notre première étude, nous avons détecté ebv-miR-BART7 sur un petit nombre d'échantillons de plasma. Les résultats étaient encourageants mais le nombre de patients était trop faible pour pouvoir juger de l'utilité de ce microARN comme biomarqueur potentiel. Il était nécessaire de compléter cette étude préliminaire avec un nombre plus important de patients NPC mais aussi de sujets contrôles : patients atteints de tumeur non-associée à EBV ou sujets sains. La description des différents patients : sexe, âge, caractéristiques cliniques et charge virale au moment du prélèvement sont présentés dans le **tableau 3**. Dix patients ont été inclus dans l'étude : 5 patients prélevés avant tout traitement, 5 autres patients ont été prélevés en rechute. Une partie de ces patients en rechute n'étaient pas traités, les autres étaient traités mais ne répondaient pas au traitement. Un patient (HEP17) a été prélevé deux fois à 1 mois et demi d'intervalle. Un témoin NPC en rémission complète ainsi que 5 témoins porteurs d'une tumeur autre qu'un NPC et un témoin en bonne santé étaient aussi inclus dans l'étude.

Les résultats de la quantification d'ebv-miR-BART7 sont présentés sur la **figure 11**. Ebv-miR-BART7 a été quantifié par PCR quantitative en utilisant une courbe de calibration obtenue à partir

d'une gamme de dilution d'un oligonucléotide synthétique de concentration connue. Le nombre de copies de miR-BART7 a ensuite été normalisé par rapport au nombre de copies de cel-miR-52 synthétique ajouté au moment de la purification d'ARN. La quantification ayant été réalisée au cours de deux expériences différentes, les résultats ont été normalisés par rapport à ceux obtenus pour HEP16 dans les deux expériences.

Le nombre de copies normalisé d'ebv-miR-BART7 est globalement plus élevé chez les patients atteints de NPC que chez les contrôles (test Mann Whitney  $p < 0.025$ ).

Néanmoins, une élévation nette de la concentration en ebv-miR-BART7 du plasma par rapport à ce qui est détecté pour les contrôles n'est observée que pour deux patients sur dix (HEP4 et HEP17+6 weeks). De façon surprenante, l'un de ces deux patients (HEP4) est atteint d'un NPC en rechute évoluant en dépit du traitement. Dans le cas de l'autre patient, une agmentation importante de la concentration plasmatique en ebv-miR-BART7 est observée après quelques semaines sans traitement.

Code patient	Age	Sexe	Pays d'origine	Statut au moment du prélèvement	Extension tumorale initiale	Charge virale
HEP 15	55	H	Cambodge	NPC actif, prélèvement avant tout traitement	cT3N0M0	<200 (28)
HEP 16	40	H	Algérie	NPC actif, prélèvement avant tout traitement	cT4N1M0	325
HEP 17	60	H	Algérie	NPC actif, prélèvement avant tout traitement	T3N1bM0	466
HEP 22	33	F	Suède	NPC actif, prélèvement avant tout traitement	cT2N3M1	<200 (67)
HEP 23	39	F		NPC actif, prélèvement avant tout traitement	T4	0
HEP 4	62	H	Algérie	NPC actif, rechute évolution sous traitement	T4N2aM0	328
HEP 6	66	H	Algérie	NPC actif, rechute, évolution sans traitement	cT1N1	<200 (31)
HEP 7	46	H	Cameroun	NPC actif, rechute, évolution sous traitement	T2N2M0	<200 (21)
HEP 8	58	H	Cambodge	NPC actif, rechute évolution sous traitement		<200
HEP 14	43	H	Maroc	NPC actif, rechute évolution sous traitement	cT3N2Mx	7065
HEP13	51	H	Algérie	NPC, rémission complète	cT4N2M1	0
EXO 098	47	H	France	Contrôle, carcinome épidermoïde larynx	T3N0M0	0
EXO 052	25	F	Portugal	Contrôle, carcinome épidermoïde, sinus maxillaire	T4aN1M0	0
EXO 089	48	H	Europe	Contrôle, carcinome épidermoïde sinus piriforme	T3N2bM0	0
EXO 107	59	F	France	Contrôle, carcinome épidermoïde peu différencié larynx	T2N02M0	0
EXO 125	51	H	France	Contrôle, carcinome épidermoïde sinus piriforme	T3N2cM0	
TBS1	53	H	Algérie	Contrôle, en bonne santé	NA	0

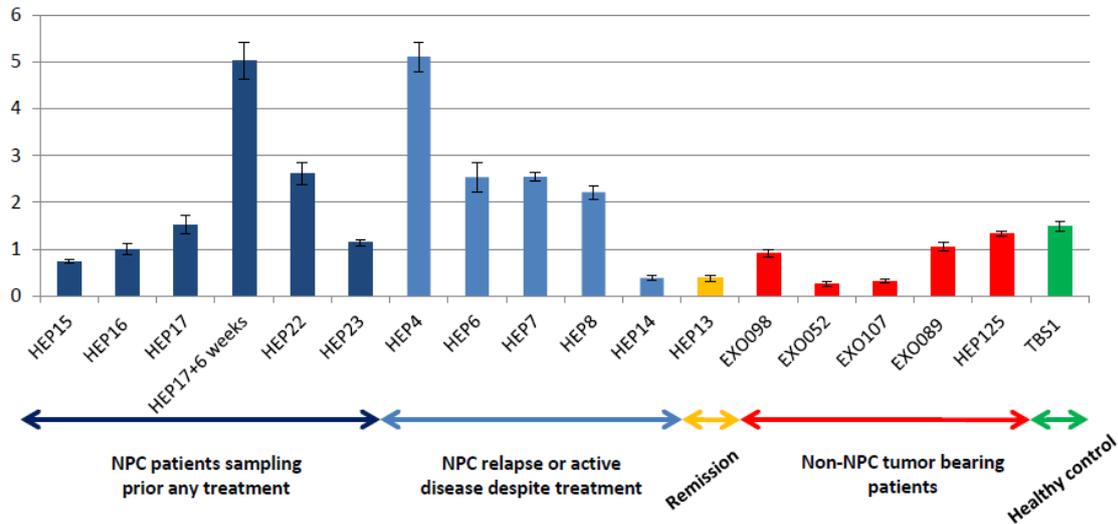
**Tableau 3 : Description des patients inclus dans l'étude.**

Le code des patients inclus dans l'étude ainsi que leur sexe et leur âge sont indiqués. Les caractéristiques cliniques sont aussi décrites et les charges virales exprimées en nombre de copies du génome viral par ml de plasma détectées au moment du prélèvement sont précisées. Cinq patients atteints de NPC ont été prélevés avant tout traitement, cinq autres patients sont atteints d'un NPC en rechute qui soit évolue en dépit du traitement ou soit n'est pas traité. Un des patients (HEP17) a été prélevé deux fois : une fois avant tout traitement et une deuxième fois 1 mois et demi après le premier prélèvement.

Sept sujets contrôles ont été inclus dans l'étude : un patient en rémission complète après un NPC ainsi que cinq patients atteints de tumeur ORL non-NPC et un témoin en bonne santé.

NA : non applicable, H : Homme, F : Femme

Normalized copies of ebv-miR-BART7



**Figure 11 : Détection d'ebv-miR-BART7 dans le plasma de quelques patients atteints de NPC. Les résultats pour cinq témoins atteints de tumeur ORL non NPC ainsi qu'un témoin sain sont indiqués en contrôle.**

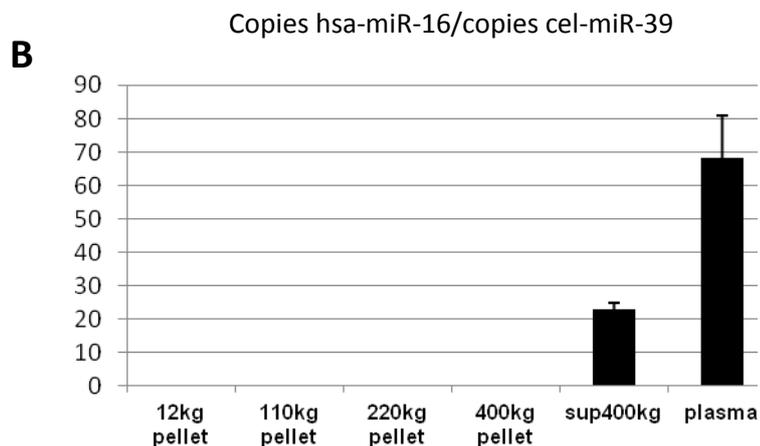
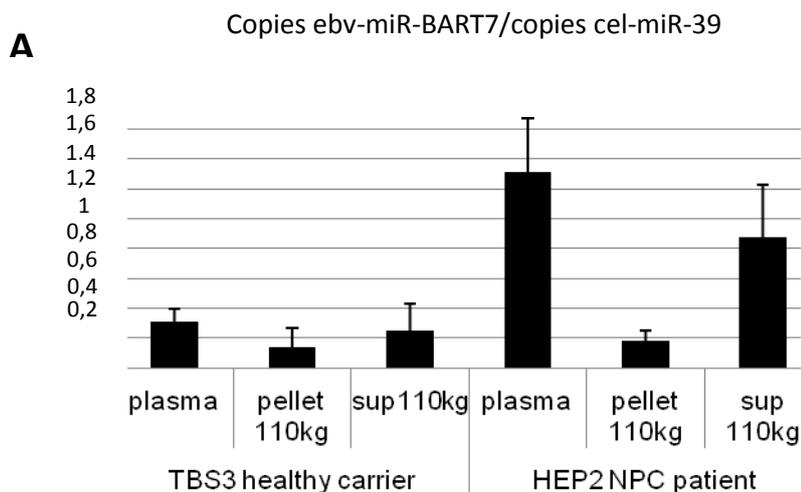
L'ARN du plasma de chaque patient a été extrait puis le nombre de copies d'ebv-miR-BART7 déterminé par QRT-PCR. Le nombre de copies d'ebv-miR-BART7 a été normalisé par rapport au nombre de copies de cel-miR-52. Les nombres de copies dans les différents échantillons ont été déterminés au cours de deux expériences différentes et les résultats des deux expériences ont été normalisés par rapport au résultat obtenu pour HEP16 dans les deux expériences. Un des patients a été prélevé à 6 semaines d'intervalle.

Deux patients ont un nombre de copies d'ebv-miR-BART7 élevé par rapport aux contrôles (HEP4 et HEP17(2)).

### La sédimentation par ultra-centrifugation est inefficace pour concentrer les exosomes et les micro-ARN du plasma

Notre équipe maîtrise bien les méthodes de purification des exosomes par centrifugation différentielle à partir de surnageants de culture cellulaire. Nous avons tenté de purifier les exosomes de plasma en utilisant cette méthode. Des échantillons de plasma provenant d'un sujet sain (TBS3) et d'un patient atteint de carcinome naso-pharyngés (HEP2) ont été soumis à une série de centrifugations jusqu'à obtention d'un culot 110 000g. L'ARN total a été extrait du plasma, du culot 110 000g et du surnageant après centrifugation à 110 000g et ebv-miR-BART 7 a été amplifié par QRT-PCR. Comme le montre la **figure 12A**, la quantité d'ARN retrouvée dans le culot 110 000g ne correspond qu'à une très faible proportion des microARN présents dans le plasma avant centrifugation. De plus, une proportion importante de microARN reste dans le plasma après

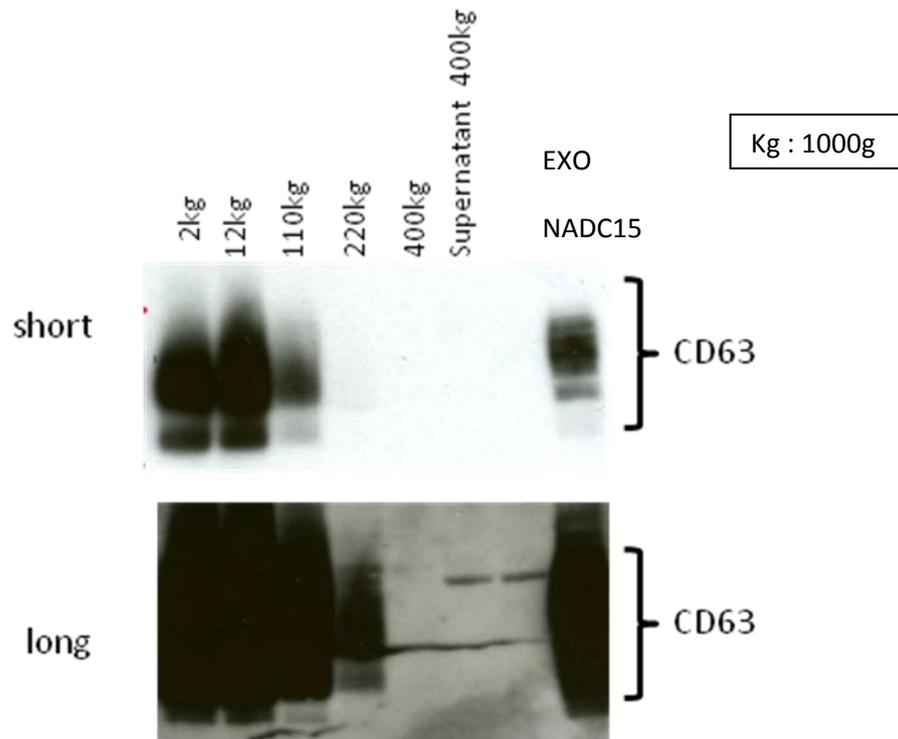
centrifugation à 110 000g. Ces résultats étaient assez surprenants. Nous avons voulu les confirmer sur un plasma non-NPC (TBS1), en quantifiant un microARN cellulaire (hsa-miR-16) en centrifugeant non-seulement à 110 000g mais aussi à 220 000g et 400 000g. Les ARN extraits du plasma brut, des culots 110 000g, 220 000g, 400 000g et du surnageant après 400 000g ont été purifiés. Enfin, le microARN humain hsa-miR-16 a été quantifié par QRT-PCR (**figure 12B**). Très peu de microARN étaient présents dans les différents culots, il en restait beaucoup en revanche dans le surnageant même après centrifugation à 400 000g. Les centrifugations réalisées même à très hautes vitesses sont donc inefficaces pour concentrer les microARN du plasma, du moins pour les durées de centrifugation utilisées. Nous avons alors émis deux hypothèses pour expliquer ces résultats : 1) notre technique ne permet pas de sédimenter les exosomes présents dans le plasma ; 2) les microARN plasmatiques ne sont pas associés aux exosomes ou seulement de façon partielle.



**Figure 12 : Absence de sédimentation des microARN du plasma dans des conditions classiques d'ultra-centrifugation**

**A . Absence de sédimentation d'ebv-miR-Bart7 plasmatique dans les culots 110 000 g.** Des culots 110 000g ont été préparés à partir de deux échantillons de plasma provenant l'un d'un patient NPC (HEP2) et l'autre d'un sujet en bonne santé (TBS3). Les ARN du plasma, du culot et du surnageant ont été purifiés et utilisés pour les analyses par PCR quantitative en temps réel. Un ARN synthétique de *c.elegans* (cel-miR-39) a été ajouté au début de la purification des ARN. Les résultats correspondent au nombre de copies du miR viral ebv-miR-BART7 normalisé par rapport à cel-miR-39 et exprimé par  $\mu$ l de plasma. Ebv-miR-Bart7 est détectable dans le plasma du patient Hep2 mais la majorité des copies ne sédimentent pas dans le culot 110 000g ; elles restent dans le surnageant. **B. Absence de concentration d'un miR cellulaire plasmatique – hsa miR16 – par ultracentrifugation à vitesse croissante.** Un échantillon de plasma provenant d'un donneur sain (TBS1) a été soumis à une série de centrifugations à vitesse croissante. Les ARN extraits des culots 12 000g, 110 000g, 220 000g, 400 000g, du surnageant après centrifugation à 400 000g et du plasma brut ont été purifiés en ajoutant cel-miR-39 au moment de la purification. Les résultats sont exprimés en copies de hsa-miR-16 normalisées par rapport à cel-miR39 et rapportées au volume de plasma. On constate qu'un faible nombre de copies d'hsa-miR-16 sédimentent même après centrifugation à 400 000g, la majorité d'entre elles restent dans le surnageant.

En vue de mieux comprendre l'absence de concentration de plusieurs microARN dans les culots d'ultra-centrifugation, nous avons voulu nous faire une idée de la distribution des exosomes dans ces différents culots. Sachant que la tétraspanine CD63 est habituellement très abondante dans les exosomes, nous avons analysé sa distribution par western blot dans les différents culots. Les résultats présentés dans la **figure 13** montrent que du CD63 est retrouvé en faible quantité dans le culot supposé contenir les exosomes (110 000g), il en reste encore un peu dans le culot 220 000g. En revanche, la concentration de CD63 est très élevée dans les culots récupérés aux étapes initiales de centrifugation : 2000 g (débris cellulaires) et 12 000 g (microvésicules), contrairement à ce qui se passe avec des surnageants de culture. On peut supposer que des débris cellulaires ou des microvésicules provenant des plaquettes sanguines ou des cellules endothéliales sont très riches en CD63 ou encore que les exosomes plasmatiques sont adsorbés sur des débris cellulaires ou des microvésicules. Quoiqu'il en soit, le western CD63 à lui seul ne permet pas de déterminer la distribution des exosomes au terme des différentes centrifugations réalisées.



**Figure 13 : Distribution de la tétraspanine CD63 dans le matériel plasmatique sédimenté suivant différentes modalités de centrifugation.**

On note une quantité très importante de CD 63 dans les culots 2 000g et 12000g. La concentration de CD63 est plus faible dans le culot 110 000g où l'on s'attend à concentrer les exosomes. Une faible quantité de CD63 est encore détectable dans le culot 220 000g mais pas dans le culot 400 000 g. CD63 n'est pas détectable dans le plasma brut ni dans le surnageant après centrifugation à 400 000g. Des quantités identiques de protéines ont été déposées dans chaque piste. Des protéines d'exosomes de la lignée de LCL (NADC15) ont été déposées dans la dernière piste comme contrôle positif (EXO NADC15).

#### **Détection de microARN humain et d'ebv-miR-BART7 dans les différentes fractions de plasma après purification sur gradient (Collaboration avec Maryse Guérin UMR S 939, Pitié Salpêtrière):**

La séparation des éléments du plasma par centrifugation de vélocité a deux inconvénients majeurs :

- 1) la vitesse de sédimentation est très influencée par la viscosité du plasma et ce paramètre est difficile à contrôler ;
- 2) les résultats sont très dépendants de la durée de centrifugation et la mise au point pour des durées très longues de centrifugation est fastidieuse. C'est pourquoi nous avons eu

recours à une méthode de flottaison sur gradient de KBr, méthode très fréquemment utilisée pour séparer les lipoprotéines plasmatiques. Cette méthode a été mise en œuvre en collaboration avec Maryse Guérin. Plusieurs échantillons de plasma ont été fractionnés sur gradient de KBr : 2 plasmas de patients atteints de NPC, 1 plasma provenant d'un donneur sain, 1 plasma de patiente atteinte de carcinome ovarien et le plasma de souris xéno greffées avec une tumeur de NPC C666 dont les cellules expriment fortement les microARN de la famille BART.

L'ARN de différentes fractions (10 fractions sur 29) a été purifié en suivant le même protocole que celui utilisé pour extraire les ARN de plasma et hsa-miR-16 et ebv-miR-BART7 amplifiés par QRT-PCR (**Figure 14 et 15**). De façon surprenante et après purification sur gradient du plasma de souris xéno greffées, un microARN cellulaire miR-16 abondant dans le plasma et dont la séquence est conservée chez l'homme et chez la souris et le microARN viral originaire de la tumeur ebv-miR-BART7 ne sont pas purifiés dans les mêmes fractions (**Figure 14**). Mir-16 est concentré dans les fractions 19 à 25 avec une concentration maximale dans la fraction 22. En revanche ebv-miR-BART7 n'était détectable que dans la fraction 28.

Pour déterminer la localisation des exosomes sur le gradient nous avons alors réalisé un western blot à partir des protéines extraites des différentes fractions et nous avons détecté le marqueur des exosomes CD63. Conformément à ce qui était attendu compte-tenu de la densité des exosomes et des différentes fractions du gradient, les exosomes sont concentrés dans les fractions 19, 20 et 22 avec un maximum pour la fraction 22 c'est-à-dire dans les fractions où se concentre la majeure partie de miR-16. Une partie au moins de miR-16 est donc co-purifiée avec les exosomes. En revanche, on ne détecte pas de CD63 dans les fractions 25 et 28. Ebv-miR-BART7 présent dans le plasma de souris C666-1 ne co-purifie donc pas avec les exosomes.

La concentration en cholestérol des différentes fractions permet de déterminer 3 pics : un pic pour les premières fractions éluées correspondant aux lipoprotéines de très faible densité (VLDL), un pic correspondant aux lipoprotéines de faible densité (LDL) et un pic correspondant aux lipoprotéines de forte densité (HDL) (**figures 14A, 14B et 15**). Les deux microARN testés ne sont pas co-purifiés avec les lipoprotéines.

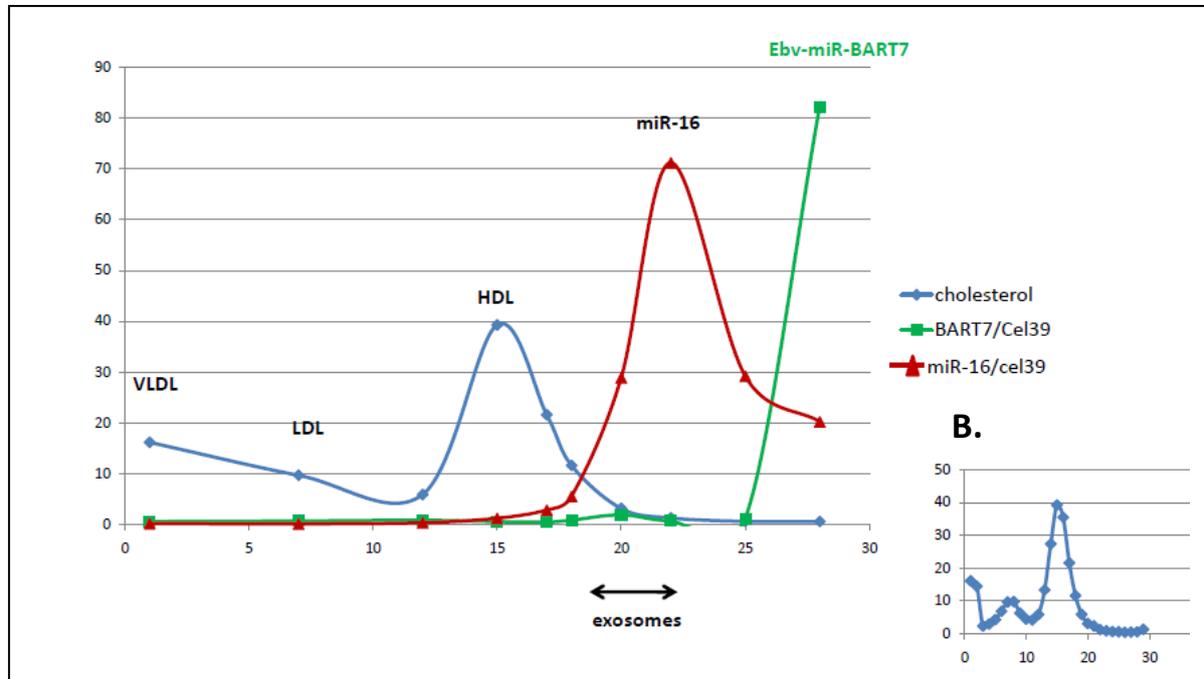
Nous avons ensuite voulu connaître la distribution de miR-16 et miR-BART 7 dans le plasma d'un patient atteint de NPC (**Figure 15**). MiR-16 est effectivement concentré dans les fractions 19 à 25. Ce résultat est reproductible pour tous les autres plasmas testés (1 plasma de patiente atteinte de carcinome ovarien et un autre plasma d'un patient atteint de NPC). En revanche, le nombre de copies d'ebv-miR-BART7 détecté dans les différentes fractions était trop faible pour déterminer

avec certitude la distribution de ce microARN dans le plasma de ce patient. S'il est effectivement présent, il semble qu'il soit concentré dans la fraction 28 conformément à ce qui est observé pour le plasma de souris mais ces résultats préliminaires doivent être reproduits sur d'autres plasmas de NPC dont la concentration en ebv-miR-BART7 est plus élevée (voir **figure 11**).

Il semble donc, à la lumière de ces résultats, que l'on puisse distinguer 2 groupes de microARN plasmatiques : les uns probablement associés aux exosomes comme miR-16 et d'autres indépendants des exosomes tel qu'ebv-miR-BART7.

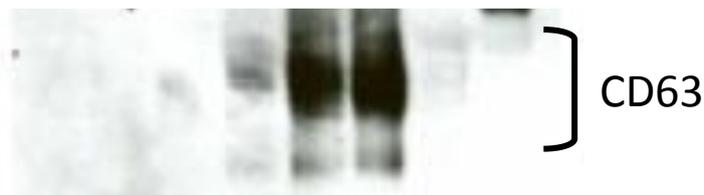
Pour en avoir la preuve, il nous reste à démontrer qu'hsa-miR-16 est bien contenu dans les exosomes, d'autant plus que d'autres auteurs ont pu démontrer qu'une partie du miR-16 plasmatique n'est pas contenu dans des vésicules (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011; Turchinovich, Weiz *et al.* 2011). C'est ce que nous avons voulu faire en centrifugeant les fractions contenant les exosomes puis en vérifiant que les exosomes sont bien retrouvés dans le culot ainsi que les microARN. Ceci fait l'objet d'expériences en cours et des résultats préliminaires semblent indiquer que si une partie du miR-16 détecté dans le plasma semble effectivement associé aux exosomes, une fraction pourrait être non vésiculaire.

### A. Fractionation of plasma from C666 mice



### C.

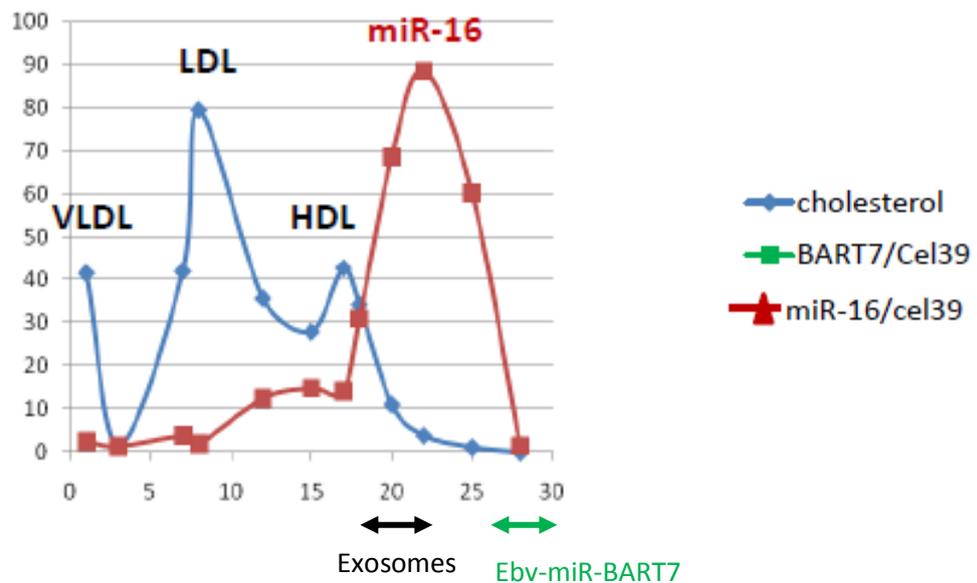
8 12 17 19 20 22 25 28



### Figure 14 : miR-BART7 présent dans le plasma de souris xéno greffées avec la tumeur C666 est purifié dans une fraction distincte des exosomes et des lipoprotéines et ne co-purifie pas avec miR-16, un microARN abondant dans le plasma.

Du plasma de souris xéno greffées avec une tumeur de la lignée C666-1 a été fractionné sur un gradient de KBr. L'ARN de 10 des 29 fractions obtenues a été purifié. Le nombre de copies du microARN cellulaires hsa-miR-16 a été déterminé par PCR quantitative en temps réel. Les résultats sont normalisés par rapport à cel-miR-39. **A. Détection de miR-16 et d'ebv-miR-BART7 dans les fractions du plasma de souris xéno greffées avec la tumeur C666-1.** La majeure partie de miR-16 est concentrée dans les fractions 19 à 25 avec un maximum pour la fraction 22. En revanche, ebv-miR-BART7 est purifié uniquement dans la fraction 28. Compte-tenu des densités des différentes fractions, la région du gradient où les exosomes doivent théoriquement être retrouvés est indiquée par une flèche noire. **B. Les microARN détectés ne sont pas co-purifiés avec les lipoprotéines.** La concentration en cholestérol est indiquée en bleu et permet de distinguer les fractions enrichies en VLDL, LDL et HDL (encart B et Figure 14A) **C. Western blot anti-CD63 à partir des fractions de plasma.** Les protéines des différentes fractions ont été purifiées puis le CD63 a été détecté après migration en conditions non-réductrices. Conformément à ce qui était attendu, le CD63 se concentre dans les fractions 19 à 22 avec un maximum pour la fraction 22.

Fractionation of plasma from a NPC patient



**Figure 15 : Détection de hsa-miR-16 dans un plasma d'un patient atteint de NPC.**

Conformément à ce qui a été obtenu dans le cas des plasmas de souris, hsa-miR-16 est concentré dans les fractions 19 à 22 avec un maximum pour la fraction 22. Le nombre de copies d'ebv-miR-BART7 détectées était trop faible pour pouvoir interpréter les résultats avec certitude mais il semble que miR-BART7 soit concentré dans la fraction 28 (flèche verte).

### **Ebv-miR-BART7 peut être immunoprécipité avec Ago2 dans les plasmas de souris.**

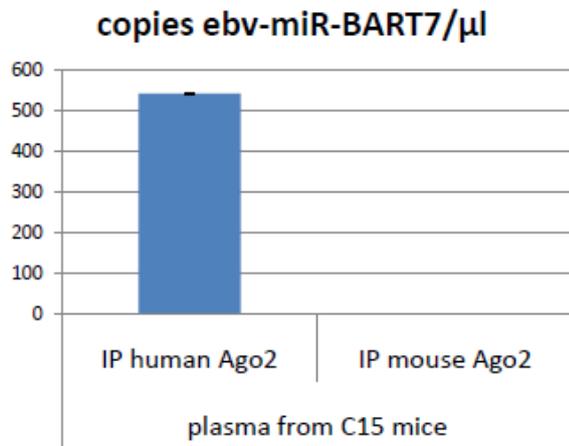
Les résultats précédents indiquaient donc que le microARN viral originaire de la tumeur ebv-miR-BART7 n'est pas purifié avec les exosomes ou les lipoprotéines. Nous avons alors envisagé qu'il puisse être associé avec Ago2 dans le sang. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons décidé d'immunoprécipiter la protéine Ago2 présente dans le plasma puis de purifier les microARN éventuellement associés et enfin de détecter ebv-miR-BART7 en QRT-PCR quantitative. Cette immunoprécipitation a été réalisée avec deux anticorps : un anticorps anti-Ago2 humaine et un anticorps anti-Ago2 murine. Lorsque l'immunoprécipitation a été réalisée sur du plasma de souris xénotransplantées avec des tumeurs de NPC C15 (**Figures 16A et 16B**), une quantité importante d'ebv-

miR-BART7 a pu être immunoprécipitée puis amplifiée par PCR avec les billes couplées aux anticorps anti-Ago2 humaines. En revanche, très peu d'ebv-miR-BART7 a été immunoprécipité avec les billes anti Ago2-murine. Ainsi, dans le plasma de souris xéno greffées, au moins une partie d'ebv-miR-BART7 est présent en association avec la protéine argonaute2 humaine confirmant son origine tumorale. D'autre part, l'immunoprécipitation est possible bien que les billes soient incubées avec du plasma dilué dans du PBS et non avec du tampon de lyse, ce qui suggère que les complexes Ago2/miR-BART7 immunoprécipités ne sont pas présents à l'intérieur de vésicules mais bien libres dans le plasma.

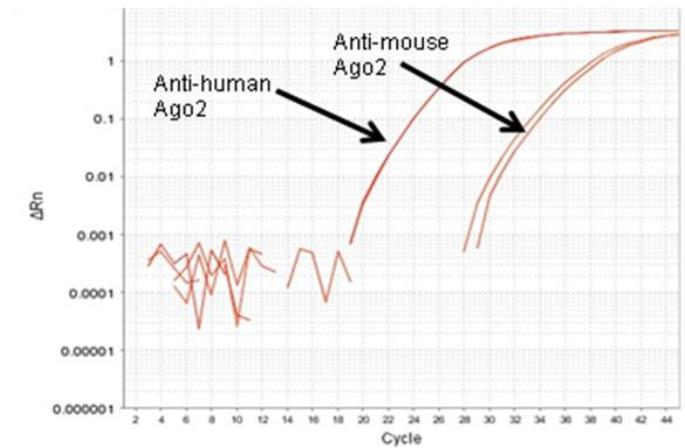
En revanche, nous ne sommes pas parvenus pour l'instant à immunoprécipiter ebv-miR-BART7 avec Ago2 dans le plasma de patients (**Figure 16C**). Des expériences sont en cours dans le but d'améliorer la technique d'immunoprécipitation.

### Ago2 immunoprecipitation from xenografted mice plasma

A.

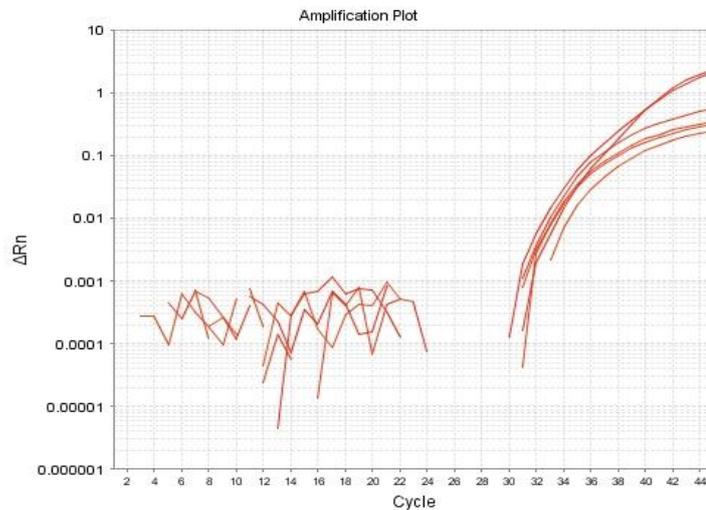


B.



C.

### Ago2 immunoprecipitation in the plasma from a NPC patient



**Figure 16 : Ebv-miR-BART7 peut être immunoprécipité avec Ago2 dans le plasma de souris mais pas dans le plasma de patients.**

16A et 16B : Immunoprecipitation d'Ago2 à partir du plasma de souris xéno greffées avec la tumeur C15. 500 $\mu$ l de plasma dilué au demi dans du PBS ont été incubés avec des billes couplées à des anticorps anti-Ago2 humaine ou anti-Ago2 murine. Les microARN immunoprécipités sur les billes ont ensuite été purifiés et ebv-miR-BART7 amplifié par QRT-PCR. La figure 16A montre les résultats en nombre de copies d'ebv-miR-BART7, la figure 16B les courbes d'amplification correspondante.  $\Delta$ Rn : intensité de la fluorescence à chaque cycle diminuée du bruit de fond. Une forte quantité d'ebv-miR-BART7 est immunoprécipitée avec la protéine Ago2 humaine. En revanche très peu d'ebv-miR-BART7 sont immunoprécipités avec la protéine Ago2 murine. 16C : Expérience identique sur les plasmas de patients. Les courbes d'amplification obtenues avec les billes couplées aux anti-Ago2 humaine et anti-Ago2 murine sont rapportées. Pas ou peu d'ebv-miR-BART7 est détecté que les microARN plasmatiques soient immunoprécipités avec l'Ago2 humaine ou l'Ago2 murine.

## 2.4 Discussion

Les microARN circulants suscitent un intérêt croissant dans le cadre des pathologies tumorales. En effet, la possibilité de détecter des microARN originaires de la tumeur dans le plasma ou le sérum pourrait apporter des informations utiles pour le diagnostic précoce, l'évaluation de l'agressivité tumorale, l'évaluation précoce de la réponse au traitement et la surveillance post-thérapeutique. La détection de ces microARN tumoraux circulants sera nettement facilitée à partir du moment où les transporteurs qui les protègent dans le sang pourront être identifiés.

Il a donc été montré dans cette étude qu'un microARN viral provenant des cellules tumorales: ebv-miR-BART7, peut être détecté dans le plasma de patients atteints de NPC. Néanmoins, cette détection est peu sensible et seuls quelques patients sont positifs lorsque sont analysés des échantillons de plasma brut. Nous avons entrepris d'augmenter la sensibilité du test en commençant par isoler les transporteurs des microARN plasmatiques avant l'extraction de l'ARN. En effet, lorsque les microARN spécifiques sont très dilués, les amorces de retrotranscription et d'amplification donnent un mauvais rapport signal-bruit. Dans le but de concentrer les microARN plasmatiques, notamment miR-BART7, nous avons commencé par purifier les exosomes du plasma. Nous nous sommes alors aperçus que si hsa-miR-16 est bien retrouvé dans les mêmes fractions que les exosomes après purification sur gradient de KBr, en revanche, ebv-miR-BART7 présent dans le plasma de souris xénogreffées est retrouvé dans une fraction distincte et non vésiculaire.

Ces résultats confirment les résultats de deux études récentes publiées alors que ce travail était en cours montrant que deux groupes de microARN sont retrouvés dans le plasma : un groupe véhiculé par les exosomes et un autre groupe qui ne serait pas transporté par ces vésicules (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011; Turchinovich, Weiz *et al.* 2011) .

J'ai montré pour la première fois qu'un microARN provenant des cellules tumorales et transporté jusque dans le plasma n'est pas véhiculé par les exosomes mais en complexe avec la protéine Ago2. Ces complexes Ago2/microARN n'ont pas été caractérisés pour l'instant. Il serait intéressant d'identifier les autres protéines présentes dans ces complexes afin de savoir s'il s'agit de complexes RISC plus ou moins altérés présents dans les cellules ou d'un autre type de complexes protéiques extra-cellulaires contenant Ago2.

D'autre part, le rôle biologique éventuel ainsi que l'origine de ces complexes sont encore inconnus : ils pourraient provenir de la destruction des cellules suite à la nécrose ou l'apoptose mais ils pourraient aussi être spécifiquement sécrétés par les cellules.

La prochaine étape de ce travail consiste à améliorer la méthode d'immunoprécipitation d'Ago2 à partir d'échantillons de plasmas humains pour vérifier si ebv-miR-BART7 peut aussi être immunoprécipité à partir de plasma humain et si cette technique apporte un avantage pour la détection des microARN tumoraux plasmatiques par rapport à une purification des ARN sur le plasma total. Si c'est le cas, nous essaierons de déterminer si d'autres microARN marqueurs de tumeurs et notamment d'autres microARN d'EBV peuvent être détectés dans le plasma par immunoprécipitation d'Ago2.

### 3) Troisième manuscrit (en préparation) :

**L'oncoprotéine LMP1 du virus d'Epstein-Barr induit une activation permanente de la PARP1 dans les cellules lymphoïdes et épithéliales**

#### 3.1 Introduction

Des observations faites par plusieurs équipes dont la nôtre, suggèrent que l'oncoprotéine LMP1 d'EBV modifie quantitativement et qualitativement la biogenèse des exosomes.

1) Sachant que la LMP1 est abondante dans les exosomes des cellules infectées par EBV (Dukers, Meij *et al.* 2000; Keryer-Bibens, Pioche-Durieu *et al.* 2006) on peut supposer qu'elle favorise l'incorporation dans les exosomes de différentes protéines partenaires (par exemple TRAF3 or PRA1). 2) Je me suis aperçue- en même temps que d'autres membres de l'équipe - que les lignées exprimant la LMP1 secrètent généralement beaucoup plus d'exosomes que des lignées sans LMP1. Ceci est particulièrement flagrant quand on compare des sous-clones transfectés dérivés d'une même lignée, les uns exprimant la LMP1, les autres n'ayant que le vecteur témoin. Si la LMP1 modifie quantitativement la production des exosomes, il est probable qu'elle la modifie aussi qualitativement. 3) La LMP1 interagit avec CD63 au sein du compartiment endosomal tardif où se forment les exosomes (Verweij, van Eijndhoven *et al.* 2011). 4) Enfin la LMP1 bouleverse considérablement les différentes voies de signalisation cellulaire ainsi que l'expression de certains gènes et donc le protéome des cellules elle-mêmes, ce qui est susceptible de retentir sur le protéome des exosomes.

Etablir un lien entre la LMP1 et les exosomes paraissait tout à fait pertinent dans l'étude des cancers associés à EBV car dans la plupart de ces tumeurs et notamment dans les NPC, il n'est pas rare que la LMP1 soit exprimée seulement par une minorité de cellules malignes (Khabir, Karray *et al.* 2005). Il est alors tentant d'imaginer qu'en modifiant le contenu des exosomes libérés par un petit nombre de cellules la LMP1 puisse néanmoins exercer une influence sur l'ensemble du micro-environnement tumoral et sur des cellules malignes qui ne l'expriment pas. En effet, il est démontré que les exosomes peuvent participer aux communications inter-cellulaires en transportant

différentes protéines et microARN de cellules « donneuses » d'exosomes vers des cellules « receveuses » d'exosomes (Valadi, Ekstrom *et al.* 2007; Skog, Wurdinger *et al.* 2008).

Le but de cette étude était donc d'étudier les modifications du protéome des exosomes résultant de l'expression cellulaire de la LMP1 en utilisant une approche basée sur la spectrométrie de masse. Comme on va le voir dans les lignes qui suivent, ces travaux nous ont conduits à une série de résultats inattendus. Dans une première étape, nous avons mis en évidence plusieurs modifications dans la composition en protéines des nano-objets contenus dans le culot 110 000 g, notamment une augmentation de la quantité de PARP1. C'était la première fois qu'on observait de la PARP1 dans le milieu extra-cellulaire. Comme on le verra dans la suite du manuscrit, au terme de nombreuses expériences et d'une longue période de tâtonnements, nous avons pu faire les constatations suivantes : 1) la PARP1 sécrétée n'est pas associée aux exosomes mais à des nano-objets qui restent à identifier ; 2) sa sécrétion est bloquée par un inhibiteur pharmacologique de PARP 1. Cette dernière constatation nous a conduit à faire l'hypothèse du scénario suivant : a) l'expression de la LMP1 entraînerait une activation permanente de la PARP1 ; b) Cette activation permanente s'accompagnerait d'une sécrétion accrue de la protéine. Les expériences exposées à la fin du manuscrit apportent des éléments en faveur des 2 volets de cette hypothèse : l'expression de la LMP1 paraît entraîner une activation permanente de la PARP1 ; la sécrétion de PARP1 est probablement liée à l'activité de la protéine.

## 3.2 Matériel et méthodes :

### Lignées cellulaires :

Les cellules HG1 et HL8 sont des lignées dérivées des cellules Hela transfectées de façon stable avec un plasmide contrôle (psv2-gpt) ou un plasmide permettant l'expression de la LMP1 (pSV2-gpt-LMP1) respectivement. Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF).

Les cellules Daudi sont des lymphocytes B dérivés d'un lymphome de Burkitt infectées par EBV qui n'expriment pas de LMP1 (Nadkarni, Nadkarni *et al.* 1969). Les cellules utilisées dans cette étude sont transfectées de façon stable avec pSV2gpt (Daudi) ou pSV2gpt-LMP1 (Daudi-LMP1). Elles sont cultivées en RPMI contenant 10% de SVF.

Les cellules C15 sont des cellules provenant de la lignée de NPC C15 entretenue par xéno greffes sur souris nude et infectées par la souche C15 d'EBV. Les cellules C15 ont été obtenues par dissociation des tumeurs xéno greffées par traitement à la collagenase tel que décrit dans (Sbih-Lammali, Clausse *et al.* 1999).

Les cellules NAD+C15 sont des cellules lymphoblastoïdes provenant de la transformation de lymphocytes B normaux provenant de donneurs par la souche C15 d'EBV (Hitt, Allday *et al.* 1989).

### **Production et séparation des exosomes et autres nano-objets extra-cellulaires par centrifugation différentielle.**

A la phase de production, les cellules sont placées pendant 48h dans un milieu pauvre en sérum (1,5%). Au bout de 48 heures, le surnageant est récolté et centrifugé à 300g pendant 10 minutes pour se débarrasser des cellules puis à 1890g pour enlever les débris cellulaires et les cellules mortes, à 12 000g pendant 35 minutes pour séparer les microvésicules et les corps apoptotiques (rotor Beckman JA25.50) et enfin centrifugé 2h à 29 000 rpm (équivalent de 110 000g 1h) dans un rotor Beckman 45Ti pour obtenir un culot dit « culot 110 000 g » contenant les exosomes mêlés à divers nano-objets biologiques extra-cellulaires.

### **Purification des exosomes par flottaison sur gradient de D2O/sucrose**

Pour purifier les exosomes et les séparer des autres objets du culot 110 000g, le culot est resuspendu dans 9ml de PBS et un coussin de 1 ml de D2O/sucrose est déposé au fond du tube. L'ensemble est alors centrifugé pendant 1h15 à 24800rpm dans un rotor Beckman SW41Ti. Après centrifugation, les exosomes flottent sur le coussin et forment un anneau (environ 1ml) qui est prélevé et déposé dans un nouveau tube. Les exosomes sont ensuite lavés dans 9 ml de PBS et centrifugés à 29 800 rpm pendant 1h30 (rotor Beckman SW41Ti). Le culot d'exosomes est ensuite lavé deux fois dans 3 ml de PBS en centrifugeant à 110 000g pendant 1h à 4°C (rotor Beckman TLA100.3). Tandis que les exosomes flottent à la surface du coussin, d'autres objets plus denses sédimentent à travers le

coussin et forment un culot au fond du tube SW41. Ces nano-objets denses peuvent être récupérés (=culot de nanomatériel dense) et lavés dans 3ml de PBS en suivant le même protocole que pour les exosomes (**figure 18**).

**Analyse protéomique des culots 110 000 g provenant de lignées exprimant ou non la LMP1** (Collaboration avec V. Ogryzko et la plateforme de protéomique de l'Institut Gustave Roussy) :

Les culots 110 000g obtenus à partir de surnageants de cellules Hela transfectées ou non avec un plasmide permettant l'expression de la LMP1 (pSV2-gpt-LMP1) ou un plasmide contrôle (pSV2-gpt) sont lysés dans du RIPA 0,1% SDS. Les protéines ont alors été séparées par électrophorèse sur gel d'acrylamide à gradient (4-12%) (Invitrogen). Après migration, les protéines ont été colorées en bleu de Coomassie. Les bandes correspondant à une différence d'expression visible entre les culots 110 000g de lignées exprimant ou non la LMP1 ont été découpées puis placées dans un eppendorf de 1,5ml. Les bandes sont alors successivement incubées 10 minutes dans une solution d'acétonitrile à 50% puis 10 minutes dans une solution d'acétonitrile pur et 10 minutes dans une solution de bicarbonate d'ammonium à 50mM. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que la coloration bleue du bleu de Coomassie ait disparu. Les bandes sont ensuite séchées au speed-vac. Cinq µl de trypsine (Promega) sont ensuite ajoutés et l'ensemble est incubé pendant 5 à 10 minutes. Cinquante µl de bicarbonate d'ammonium contenant 5% d'acétonitrile sont ensuite ajoutés pour une incubation sur la nuit. Les tubes sont alors centrifugés et le surnageant déposé dans un nouveau tube. Le contenu du tube est séché au speed-vac et le culot dissout dans 20µl d'une solution d'acétonitrile à 3% contenant 0,1% d'acide formique.

Les peptides présents dans les tubes ont ensuite été analysés en spectrométrie de masse par Nano-LC-MS/MS. L'analyse des peptides identifiés et la recherche de protéines a été effectuée en utilisant le logiciel Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)).

**Analyse des protéines en western-blot**

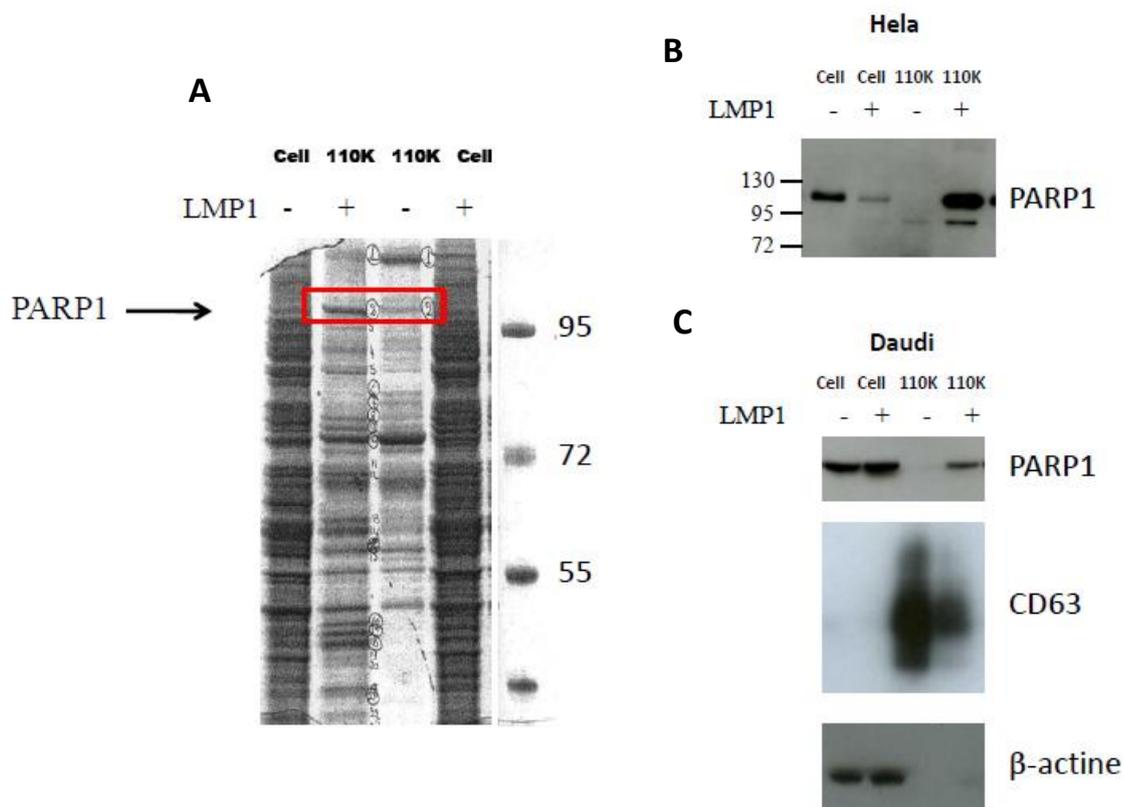
4 à 20 µg de protéines ont été séparés sur des gels précoulés avec un gradient (Pierce) ou des gels d'acryl/Bisacryl 10 %. Les protéines ont ensuite été transférées sur des membranes PVDF (Millipore) dans un tampon contenant 20% de méthanol. La migration est effectuée en conditions réductrices pour la détection de la LMP1, la PARP1 et en conditions non-réductrices pour détecter les tétraspanines CD63. La LMP1 est détectée avec du surnageant d'hybridome CS1-4 fourni par Martin Rowe dilué au 1/16<sup>ème</sup>. L'anticorps anti-PARP1 (Calbiochem) est un monoclonal de souris et

est diluée au 1/100<sup>ème</sup>, l'anticorps monoclonal de souris anti-CD63 (TS63) nous a été donné par Eric Rubinstein (Inserm U1004, Villejuif) et est dilué au 1/2000<sup>ème</sup>.

### 3.3 Résultats

#### **L'oncoprotéine LMP1 d'EBV induit la libération de PARP1**

Pour déterminer l'impact de la LMP1 sur le protéome des exosomes nous avons purifié le culot 110 000g à partir du surnageant de cellules Hela transfectées de façon stable avec un plasmide permettant l'expression de la LMP1 (pSV2-gpt-LMP1) ou un plasmide contrôle (pSV2-gpt). Les protéines de ce culot ont été séparées par électrophorèse avant analyse par spectrométrie de masse (**Figure 17**). Une des protéines identifiées dans le culot 110 000g de cellules Hela était la PARP1 ce qui était surprenant car c'est une protéine nucléaire. Cette protéine était plus abondante dans le culot 110 000g obtenu à partir de surnageant de cellules Hela exprimant la LMP1 que dans celui purifié à partir de surnageant de Hela n'exprimant pas la LMP1. Ces résultats ont été confirmés en western-blot sur les Hela mais aussi sur une lignée lymphocytaire dérivée d'un lymphome de Burkitt : des Daudi transfectées avec le plasmide pSV2-gpt-LMP1 et des Daudi transfectées avec un plasmide contrôle pSV2-gpt. Les Daudi sont dérivés d'un lymphome de Burkitt et contiennent le génome viral mais n'expriment pas naturellement la LMP1. Nous n'avons pas observé de corrélation entre l'expression de la LMP1 et les niveaux d'expression de PARP1 dans les cellules.



**Figure 17 : Les cellules exprimant la LMP1 sécrètent de la PARP1**

17.A. Les protéines des culots 110 000g et d'extraits cellulaires totaux de cellules HeLa transfectées de façon stable – contenant un plasmide codant la LMP1 ou un plasmide contrôle - ont été séparées par électrophorèse et colorées en bleu de Coomassie. Les protéines pour lesquelles des différences quantitatives entre culots 110 000g LMP1pos ou LMP1neg étaient visibles sur le gel ont été analysées en spectrométrie de masse. La PARP1 a été identifiée au niveau des bandes encadrées en rouge. Les résultats de la spectrométrie de masse ont ensuite été vérifiés en western-blot sur les protéines provenant des extraits cellulaires et des culot 110 000g. Nous avons comparé des cellules HeLa LMP1-positives ou négatives puis des cellules de lymphome de Burkitt (Daudi) exprimant ou non la LMP1 (17.B et 17.C). Pour ces deux lignées cellulaires on observe une augmentation de l'abondance de PARP1 dans les culots 110 000g lorsque la LMP1 est exprimée dans les cellules.

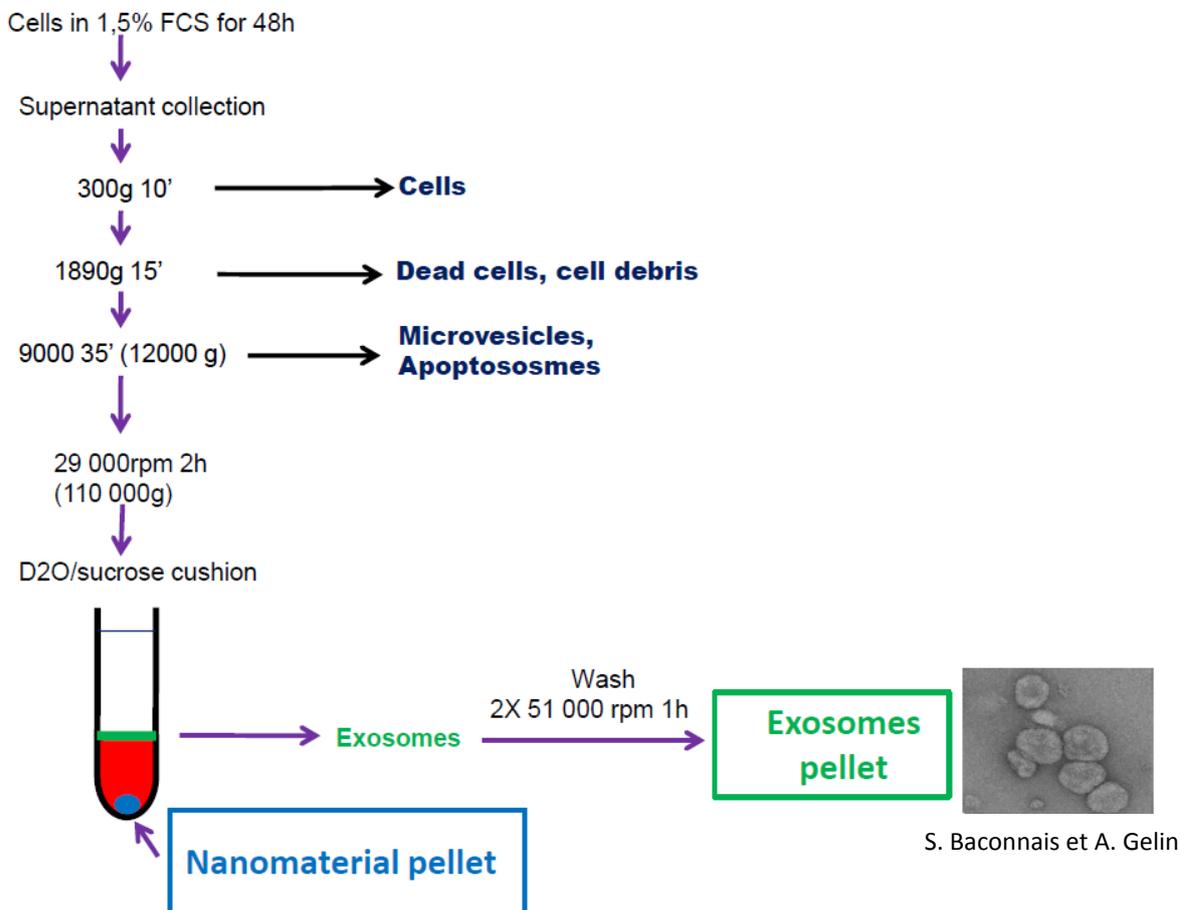
110K : culot 110 000g

**La PARP1 sécrétée n'est pas associée aux exosomes.**

Nous avons alors voulu vérifier que la PARP1 libérée par les cellules était associée aux exosomes. Pour cela nous avons purifié les exosomes par flottaison sur gradient (figure 18). Nous avons vérifié en microscopie électronique que les préparations d'exosomes ainsi obtenues ne contenaient quasiment plus de contaminants.

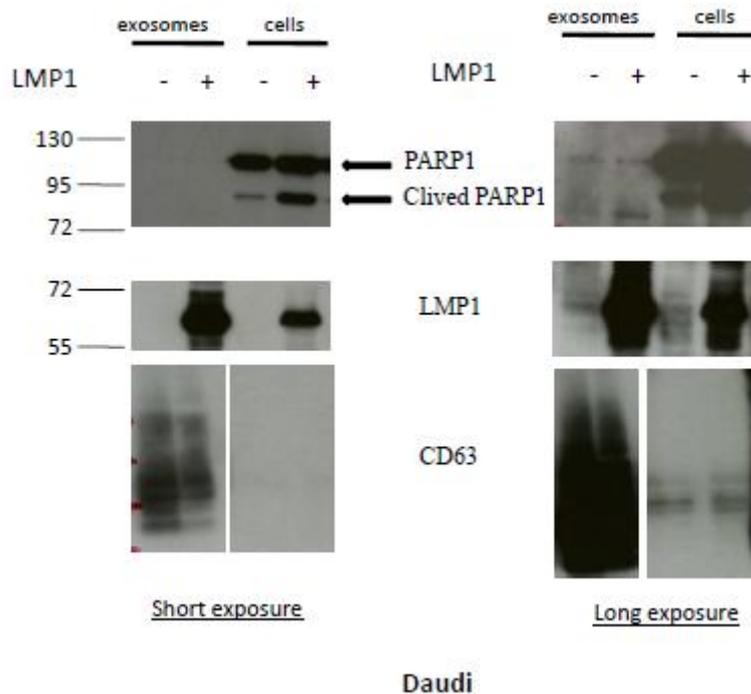
La **figure 19** montre la détection de la PARP1 en western blot sur les exosomes de cellules Daudi exprimant ou non la LMP1. Le CD63 est un marqueur des exosomes et permet de vérifier la qualité de la préparation.

De façon inattendue, la PARP1 n'est pas ou très peu détectée dans les exosomes.



**Figure 18 : Méthode de purification des exosomes par centrifugation différentielle et flottaison sur gradient de D2O/sucrose et définition du culot après passage sur gradient ou « nanomaterial pellet ».**

Les cellules sont placées dans du milieu pauvre en sérum pendant 48 heures puis le surnageant est centrifugé successivement à 300g, 1890g et 12000g pour éliminer les cellules, les débris cellulaires, les microvésicules et les corps apoptotiques. Le surnageant est ensuite centrifugé à 110 000g pendant 2h pour obtenir un culot d'exosomes qui est ensuite purifié sur gradient : 1ml de D2O/sucrose est déposé au fond du tube qui est centrifugé. Après centrifugation, les exosomes flottent sur le coussin de D2O/sucrose. Ils sont alors prélevés puis lavés une première fois dans 9ml de PBS puis 2 fois dans 3ml de PBS. Le culot présent dans le fond du tube après ajout du D2O/sucrose et centrifugation (« nanomaterial pellet ») peut aussi être récupéré et lavé.



**Figure 19: La PARP1 extra-cellulaire n'est pas dans les exosomes.**

Les exosomes de Daudi-contrôle et Daudi-LMP1 ont été purifiés sur gradient de D2O/sucrose, les protéines extraites et la PARP1 détectée en western-blot. Le CD63, marqueur des exosomes, permet de vérifier la qualité de la purification. La détection de la LMP1 est indiquée en contrôle. L'abondance de la PARP1 est très faible dans les exosomes.

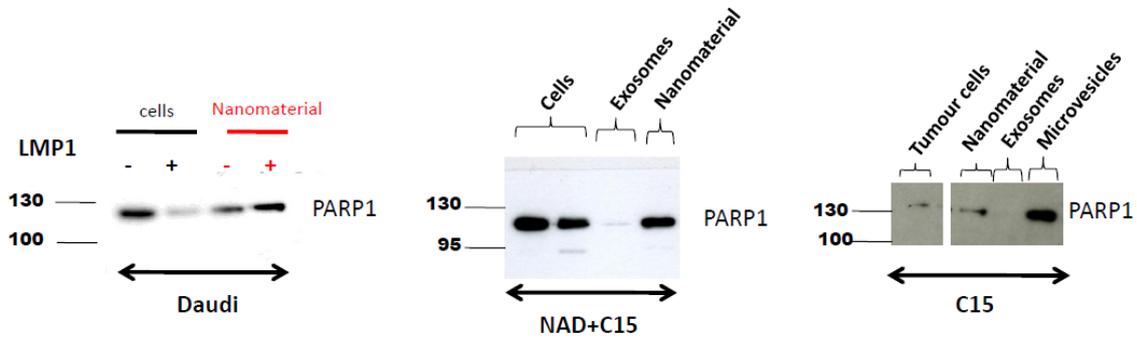
### La PARP1 libérée par des lignées exprimant la LMP1 et/ou infectées par EBV est présente au sein d'éléments chromatinien non vésiculaires

Puisque les exosomes ne sont pas les véhicules de la PARP1 extra-cellulaire, nous nous sommes demandé s'ils n'étaient pas concentrés dans le culot formé par des éléments denses sédimentant à travers le coussin de D2O/sucrose (dense nanomaterial pellet) (**Figure 18**). Les protéines contenues dans ces culots denses provenant soit des cellules Daudi et soit des cellules Daudi-LMP1 ont été séparées par électrophorèse et la PARP1 recherchée par analyse en western-Blot. Nous avons confirmé que la PARP1 peut-être détecté dans ces culots de nanomaterial dense (**figure 20A**). Nous avons constaté en outre qu'une petite quantité de PARP1 peut être détectée dans ces culots même en l'absence d'expression de la LMP1. Cependant il est clair que la quantité de PARP1 associée à ces éléments denses augmente lorsque les cellules productrices expriment la LMP1. Nous avons de plus

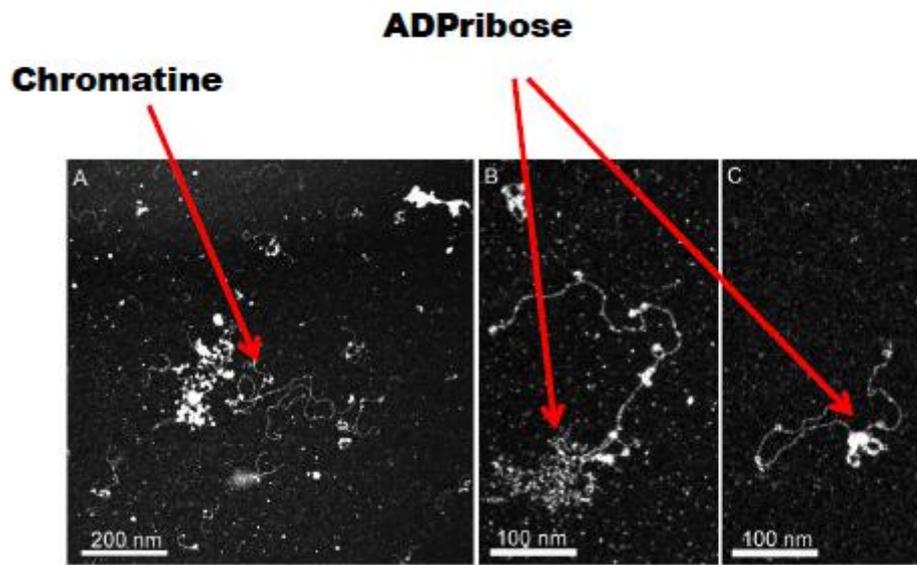
déte té la PARP1 dans ce culot de nano-matériel dense dans des lignées infectées par EBV exprimant naturellement la LMP1 : une lignée de LCL (NAD+C15) et une lignée de NPC (C15). D'autres expériences réalisées dans l'équipe sur un éventail plus large de lignées infectées ou non par EBV ont permis de montrer que cette sécrétion de PARP1 extra-cellulaire est observée soit dans des lignées infectées par EBV, surtout si il y a expression de la LMP1, soit dans des lignées transfectées exprimant une forme exogène de LMP1 .

Les culots de nano-matériel dense ont ensuite été observés en microscopie électronique dans le but de comprendre quel pouvait être le véhicule de la PARP1 extra-cellulaire. Les résultats sont présentés sur la **figure 20B**. Ces culots contiennent peu d'éléments vésiculaires mais surtout des filaments évocateurs d'ADN associés à des protéines chromatinienne. A fort grossissement des éléments sphériques évocateurs de nucléosomes peuvent être observés. En outre sur certains filaments se greffent des structures arborescentes évocatrices de grands polymères d'ADP-ribose.

**A**



**B**



Fraction ADN/Protéines observée en coloration positive  
On reconnaît de la chromatine (A) et présence de polymère ADPribosylation ( B-C)

**Figure 20: La PARP1 libérée dans le milieu extra-cellulaire est associée à des complexes chromatiniens.**

**A.**Détection de la PARP1 en western-blot dans des extraits cellulaires, des extraits d'exosomes purifiés sur gradients et des extraits du culot dense. Les expériences ont été réalisées sur la lignée de lymphome de Burkitt infectée par EBV Daudi, une lignée lymphoblastoïde (LCL) infectée par la souche C15 d'EBV et exprimant la LMP1 (NAD+C15) et la lignée C15 : une lignée obtenue à partir d'un NPC, entretenue par xénogreffes sur souris nude et exprimant la LMP1. La PARP1 est peu abondante ou absente dans les exosomes mais est, en revanche, très abondante dans les culots de nanomatériel dense.

**B.** Observation en microscopie électronique du culot de nanomatériel dense. De l'ADN associé à des protéines est visible dans ce culot. Certaines images évoquent une poly(ADP-ribose)ation de l'ADN.

### 3.4. Discussion

Nous avons donc observé que des lignées transfectées de façon stable par la LMP1 mais aussi de lignées infectées par EBV et exprimant naturellement la LMP1 (LCL et lignée dérivée d'un NPC) libèrent de la PARP1 extra-cellulaire. La présence de PARP1 clivée dans certains cas mais pas dans tous ainsi que l'observation qu'une partie au moins de l'ADN extra-cellulaire est de haut poids moléculaire nous indiquent que si une partie de ces complexes ADN/protéines sont sûrement libérés suite à l'apoptose des cellules ce n'est sans doute pas toujours le cas. On pourrait alors envisager la sécrétion de ces complexes par les cellules exprimant la LMP1 par des mécanismes restant à élucider.

Des observations récentes encore préliminaires suggèrent que la sécrétion de PARP1 est liée à une activation de cette enzyme. En effet, à l'aide d'un anticorps anti-poly-ADP ribose, on peut détecter en immunofluorescence un niveau global élevé de poly-ADP-ribosylation dans les cellules Daudi transfectées exprimant de façon stable la LMP1, par comparaison avec les cellules Daudi-contrôle, alors même que la concentration de PARP est identique dans les deux types cellulaires. D'autre part le traitement des cellules Daudi par un inhibiteur de PARP, PJ34, fait décroître la libération extra-cellulaire de PARP1. Nos travaux en cours visent à déterminer si on est bien en présence d'une nouvelle propriété de la LMP1, à savoir la capacité d'activer la PARP1. Il faudra aussi examiner l'hypothèse d'une diminution de l'expression et/ou de l'activité de l'enzyme PARG qui catalyse la dégradation des polymères d'ADP-ribose dans la cellule.

Parallèlement notre équipe cherche à caractériser des complexes ADN-protéines non-vésiculaires qui sont libérés par la plupart des types cellulaires étudiés même en l'absence de libération de PARP1 (voir discussion générale).

# **Discussion Générale**

Cette discussion générale portera sur les deux principaux volets de ma thèse : l'étude des microARN d'EBV extra-cellulaires et l'influence de l'oncoprotéine LMP1 d'EBV sur l'activité et la libération extra-cellulaire de la PARP1. Ces deux thèmes de travail dérivent de mes études initiales sur les exosomes sécrétés par les cellules lymphoïdes ou épithéliales infectées par EBV.

Je me suis intéressée d'une part aux transports de microARN viraux par les exosomes et j'ai été amenée à changer de perspectives en réalisant que des microARN extra-cellulaires étaient véhiculés par des complexes protéiques distincts des exosomes. D'autre part, j'ai étudié les modifications de la composition protéique des exosomes induites par la LMP1. Là encore, j'ai été conduite à modifier mes objectifs en traitant de la sécrétion de PARP1 associée à des nano-objets extra-cellulaires. En outre, j'ai constaté que cette sécrétion de PARP1 était dépendante au moins en partie d'une activation de cette enzyme.

La première partie de ma thèse consistait à étudier le transport des microARN par les exosomes, particulièrement les microARN d'EBV. Au départ, nous avions un double objectif à long terme : 1) Savoir si les exosomes tumoraux présents dans les liquides biologiques pouvaient être des véhicules permettant des transferts horizontaux de microARN viraux de cellule à cellule ; 2) Savoir si les microARN viraux contenus dans les exosomes pouvaient servir de biomarqueurs ou d'indicateurs pour le dépistage, l'évaluation du pronostic et la surveillance des NPC. Au cours du travail, compte-tenu de la complexité des phénomènes observés, nous avons préféré privilégier le deuxième objectif.

Dans notre article publié dans *Virology Journal* en 2010, nous avons pu montrer pour la première fois que les microARN viraux miR-BART sont présents dans les exosomes sécrétés par les lignées de carcinomes naso-pharyngés et que ces miR-BART diffusent à distance dans le sang de souris xénotransplantées et de patients atteints de NPC. Notre conclusion laissait entendre sans l'affirmer que les miR-BART plasmatiques étaient véhiculés eux aussi par des exosomes. A cette étape, la suite logique consistait à isoler les exosomes du plasma des malades porteurs de NPC pour augmenter la sensibilité de détection des miR-BART. Cependant, comme le montre la deuxième partie de la section « résultats », toutes nos tentatives ont été vaines et nous avons obtenu - surtout chez la souris xénotransplantée - des arguments expérimentaux permettant d'affirmer l'absence de copurification de miR-BART7 avec les exosomes plasmatiques. Ceci contrastant avec la copurification de miR-16 avec ces mêmes exosomes. En collaboration avec Maryse Guérin (UMR

S939, Pitié-Salpêtrière), nous avons également montré que miRBART7 n'était pas véhiculé par des lipoprotéines de type HDL.

Heureusement, au même moment, deux publications ont renouvelé notre vision du transport des microARN plasmatiques (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011; Turchinovich, Weiz *et al.* 2011). Il est devenu clair que seule une fraction probablement minoritaire des microARN plasmatiques est transportée par les exosomes. Beaucoup d'autres sont transportés par des objets de beaucoup plus petite taille si l'on en juge par leur élution tardive en chromatographie d'exclusion et leur passage dans des filtres retenant des complexes protéiques de masse supérieur à 300 kDa (Arroyo, Chevillet *et al.* 2011; Turchinovich, Weiz *et al.* 2011). Ces objets ont la particularité de contenir la protéine Ago2 et d'être capturés ou immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-Ago2, en l'absence de détergents. Pour Turchinovich *et al.*, il s'agit de complexes RISC partiellement dégradés libérés par des cellules mortes mais ils n'en donnent pas la preuve formelle. On peut aussi imaginer qu'Ago2 et les microARN sont incorporés dans des complexes destinés à la sécrétion et distincts des complexes RISC même si cela reste purement spéculatif pour l'instant.

Quoiqu'il en soit, stimulés par ces données, nous avons tenté une capture de miR-BART7 à l'aide d'anticorps anti-Ago2 dans le plasma de souris porteuse de NPC xéno greffés. Les premiers essais sur des plasmas de patients porteurs de NPC n'ont pas été concluants, mais ces expériences doivent être répétées dans de meilleures conditions. Il y aurait ainsi deux populations de microARN extracellulaires dans le sang : une partie contenue dans des vésicules et qui proviendrait peut être de la sécrétion d'exosomes et de microvésicules par des cellules présentes dans le sang ou en contact avec celui-ci (lymphocytes, plaquettes, cellules endothéliales etc) mais aussi une autre partie libérée dans des complexes Ago2/microARN par ces même cellules ou des cellules distantes telles que les cellules tumorales.

Les résultats des équipes de Barbara Burwinckel et de Muneesh Tewari ainsi que les nôtres montrent que chercher des marqueurs tumoraux en analysant le profil des microARN présents dans les exosomes plasmatiques n'est pas forcément la bonne stratégie pour tous les cancers et qu'il sera nécessaire d'analyser aussi les microARN associés à Ago2.

Très récemment une publication par A.M.G. Wong *et al.* rapporte la détection de 12 mir-Bart dans une série de 15 échantillons de sérum provenant de patients NPC à des concentrations bien supérieures à celles observées dans 15 échantillons provenant de donneurs ayant la même répartition du point de vue de l'âge et du sexe. La lecture du résumé et du titre suggère une très grande spécificité de détection de ces miRs dans les plasmas de NPC. Cependant l'examen attentif

des données révèle plusieurs faits à prendre en considération. L'absence quasi-totale de détection des miR-BART chez les sujets contrôles y compris pour miR-BART7 contraste avec nos propres résultats et pour l'instant, nous n'avons pas d'explications sur ce point. On peut se demander si cette différence n'est pas liée à l'utilisation d'échantillons de sérum plutôt que de plasma. Par ailleurs, dans les matériels et méthodes, les auteurs ne précisent pas s'ils ont effectué une étape de pré-amplification suivant l'étape de rétro-transcription. A noter que les sujets contrôles sont uniquement des sujets en bonne santé alors que notre étude a également porté sur des échantillons de patients porteurs de tumeurs non-NPC. Cependant, cela n'explique pas la différence car dans notre étude, miR-BART7 était détectable chez des donneurs sains. Dans la figure 3 de Wong *et al.*, quatre miR-BART apparaissent à des taux élevés dans le sérum, BART 1-3p, BART 6-5p, BART17-5p. Si la spécificité de détection de ces miR se confirme, surtout pour miR-BART 17-5p, on peut espérer les voir jouer un rôle en clinique, y compris pour le dépistage (Wong, Kong *et al.* 2011).

La deuxième partie de ma thèse m'a permis de mettre en évidence une augmentation de la libération de PARP1 par les cellules induite par la LMP1 par une approche basée sur des analyses en spectrométrie de masse et confirmée par western blot. L'amplitude de cette augmentation est variable suivant les expériences mais elle s'observe aussi bien pour les cellules épithéliales que pour les cellules lymphocytaires. Fait remarquable, la PARP1 extra-cellulaire n'est jamais associée aux exosomes – contrairement à l'oncoprotéine LMP1 - mais à des objets plus denses que les exosomes contenant à la fois de l'ADN et des protéines notamment des histones comme cela a été montré en combinant examen en microscopie électronique, western blot et Southern blot. Ces nano-objets non-vésiculaires sont toujours en cours de caractérisation dans l'équipe. Du point de vue morphologique, les amas protéiques provenant de cellules exprimant la LMP1 sont plus gros que ceux issus de cellules n'exprimant pas cette protéine.

La sécrétion de complexes associant ADN et protéines par les cellules est connue depuis 1948 et les expériences de Mandel et Métais (Mandel and Metais 1948). Depuis, différentes études ont montré que ces complexes peuvent être sécrétés par les cellules tumorales et peuvent être retrouvés dans le plasma. Les mécanismes de sécrétion des complexes ADN/protéines sont inconnus et leur origine est très controversée. Trois mécanismes ont été proposés : sécrétion par les cellules vivantes, libération lors de l'apoptose ou libération en cas de nécrose des cellules. Suivant les cas, la PARP1 retrouvée dans les complexes ADN-protéines est parfois clivée, ce qui pourrait témoigner d'un

phénomène d'apoptose en cours dans une partie au moins des cellules productrices. En revanche, des expériences préliminaires réalisées dans l'équipe montrent qu'au moins une fraction de l'ADN associée à la PARP1 conserve un poids moléculaire élevé (> 30 kb), ce qui suggère qu'il ne provient pas de cellules apoptotiques.

Au cours de ces derniers mois, les travaux de l'équipe ont montré que beaucoup d'autres types cellulaires secrètent des complexes ADN/protéines semblables à ceux qui contiennent la PARP1 extra-cellulaire. Cependant la PARP1 est rarement détectée dans ces complexes en l'absence d'une infection latente par EBV et/ou d'une expression artificielle de la LMP1 par transfection.

Comme nous l'avons dit dans la partie 3 de la section résultats, nous avons des données préliminaires suggérant que la PARP1 intra-cellulaire est activée par la LMP1 et que son activité enzymatique est l'un des éléments requis pour sa libération extra-cellulaire. Nous travaillons activement à la confirmation de ces deux points.

On sait que la LMP1 interfère avec les mécanismes de réparation de l'ADN (Ma, Kawanishi *et al.* 2008; Faumont, Le Clorenec *et al.* 2009) . Par exemple, elle réduit l'expression d'ATM et de DDB1 (DNA damage-binding protein) et supprime un check-point en G2 (Chen, Liu *et al.* 2008; Gruhne, Sompallae *et al.* 2009). Nous nous proposons de voir si les mêmes mutants de la LMP1 qui sont invalidés pour l'inhibition d'ATM ou de DDB1 sont aussi invalidés pour l'activation de la PARP1.

Si l'influence de la LMP1 sur l'activité de la PARP1 se confirme, il faudra envisager les conséquences de ce phénomène pour la biologie du virus d'Epstein-Barr et pour son rôle en pathologie tumorale et peut-être en pathologie auto-immune.

Pour mémoire, il est connu que la PARP1 joue un rôle dans le cycle viral d'EBV en s'associant à l'oriP : l'origine de réplication du virus et en induisant la synthèse de polymères de polyADP-ribose sur la protéine EBNA1 (Tempera, Deng *et al.* 2010) (cf. introduction). Il serait donc intéressant de savoir si la libération extra-cellulaire de PARP joue un rôle dans l'établissement ou le maintien de la latence ou dans le cycle lytique.

L'expression de la PARP1 ainsi que la poly(ADP-ribosyl)ation est dérégulée dans de nombreux cancers (Masutani, Nakagama *et al.* 2005). On peut donc supposer que l'oncoprotéine LMP1

contribue au développement de tumeurs malignes associés à EBV en modifiant l'activité de la PARP1 et peut-être en induisant sa libération.

D'autre part, on sait que la PARP1 favorise les réactions inflammatoires et les manifestations auto-immunes. Ainsi l'activation de la PARP1 favorise le développement de l'encéphalopathie allergique expérimentale (EAE), un modèle très utilisé pour l'étude de la sclérose en plaques (Farez, Quintana et al. 2009). L'activation de la PARP1 par la LMP1 pourrait jouer un rôle dans l'induction de manifestations auto-immunes par EBV, a fortiori si la PARP1 extra-cellulaire est active et si des exosomes vecteurs de LMP1 vont activer la PARP1 dans des cellules distantes des cellules infectées.

# **Bibliographie**

- Al-Nedawi, K., B. Meehan, et al. (2009). "Endothelial expression of autocrine VEGF upon the uptake of tumor-derived microvesicles containing oncogenic EGFR." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(10): 3794-9.
- Al-Nedawi, K., B. Meehan, et al. (2009). "Microvesicles: messengers and mediators of tumor progression." *Cell Cycle* **8**(13): 2014-8.
- Al Tabaa, Y., E. Tuailon, et al. (2009). "Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells." *Blood* **113**(3): 604-11.
- Aravin, A. A., M. Lagos-Quintana, et al. (2003). "The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development." *Dev Cell* **5**(2): 337-50.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, et al. "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 5003-8.
- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, et al. (2011). "Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 5003-8.
- Babashah, S. and M. Soleimani (2011). "The oncogenic and tumour suppressive roles of microRNAs in cancer and apoptosis." *Eur J Cancer*.
- Babcock, G. J., L. L. Decker, et al. (1998). "EBV persistence in memory B cells in vivo." *Immunity* **9**(3): 395-404.
- Baillat, D. and R. Shiekhatar (2009). "Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins." *Mol Cell Biol* **29**(15): 4144-55.
- Barrès, C. (2009). La galectine-5 associée aux exosomes de réticulocyte de rat: Caractérisation et étude fonctionnelle. Université Montpellier II. **Doctorat**.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-97.
- Barth, S., T. Pfuhl, et al. (2008). "Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5." *Nucleic Acids Res* **36**(2): 666-75.
- Beezhold, K. J., V. Castranova, et al. (2010). "Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention." *Mol Cancer* **9**: 134.
- Bei, J. X., Y. Li, et al. (2010). "A genome-wide association study of nasopharyngeal carcinoma identifies three new susceptibility loci." *Nat Genet* **42**(7): 599-603.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, et al. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference." *Nature* **409**(6818): 363-6.
- Biegging, K. T., L. J. Anderson, et al. (2010). Regulation of EBV Latency by LMP2A. *Epstein-Barr Virus*. E. S. Robertson. Norfolk, Caister Academic Press: 135-153.
- Boehler, C., L. R. Gauthier, et al. (2011). "Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(7): 2783-8.
- Booth, A. M., Y. Fang, et al. (2006). "Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane." *J Cell Biol* **172**(6): 923-35.
- Bouchard, V. J., M. Rouleau, et al. (2003). "PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage." *Exp Hematol* **31**(6): 446-54.
- Bouvier, G., S. Poirier, et al. (1991). "Epstein-Barr virus activators, mutagens and volatile nitrosamines in preserved food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma." *IARC Sci Publ*(105): 204-9.
- Busson, P., T. Ooka, et al. (2004). "[Nasopharyngeal carcinomas and Epstein-Barr virus: from epidemiology and detection to therapy]." *Med Sci (Paris)* **20**(4): 453-7.
- Caby, M. P., D. Lankar, et al. (2005). "Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma." *Int Immunol* **17**(7): 879-87.
- Cai, X., A. Schafer, et al. (2006). "Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed." *PLoS Pathog* **2**(3): e23.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, et al. (1998). "Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals." *Immunity* **9**(3): 405-11.

- Cameron, J. E., Q. Yin, et al. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cellular MicroRNA miR-146a, a modulator of lymphocyte signaling pathways." *J Virol* **82**(4): 1946-58.
- Chambon, P., J. D. Weill, et al. (1963). "Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme." *Biochem Biophys Res Commun* **11**: 39-43.
- Chan, K. C., J. Zhang, et al. (2003). "Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients." *Cancer Res* **63**(9): 2028-32.
- Chang, E. T. and H. O. Adami (2006). "The enigmatic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **15**(10): 1765-77.
- Chang, K. P., Y. T. Chang, et al. (2011). "Multiplexed immunobead-based profiling of cytokine markers for detection of nasopharyngeal carcinoma and prognosis of patient survival." *Head Neck* **33**(6): 886-97.
- Chang, K. P., S. P. Hao, et al. (2008). "Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes." *Clin Cancer Res* **14**(21): 6979-87.
- Chen, C. Y., D. Zheng, et al. (2009). "Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps." *Nat Struct Mol Biol* **16**(11): 1160-6.
- Chen, X., Y. Ba, et al. (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." *Cell Res* **18**(10): 997-1006.
- Chen, Y. R., M. T. Liu, et al. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 represses DNA repair through the PI3K/Akt/FOXO3a pathway in human epithelial cells." *J Virol* **82**(16): 8124-37.
- Cheng, Q., N. Barboule, et al. (2011). "Ku counteracts mobilization of PARP1 and MRN in chromatin damaged with DNA double-strand breaks." *Nucleic Acids Res.*
- Chevallier-Greco, A., H. Gruffat, et al. (1989). "The Epstein-Barr virus (EBV) DR enhancer contains two functionally different domains: domain A is constitutive and cell specific, domain B is transactivated by the EBV early protein R." *J Virol* **63**(2): 615-23.
- Chevallier-Greco, A., E. Manet, et al. (1986). "Both Epstein-Barr virus (EBV)-encoded trans-acting factors, EB1 and EB2, are required to activate transcription from an EBV early promoter." *Embo J* **5**(12): 3243-9.
- Chien, Y. C., J. Y. Chen, et al. (2001). "Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men." *N Engl J Med* **345**(26): 1877-82.
- Choy, E. Y., K. L. Siu, et al. (2008). "An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival." *J Exp Med* **205**(11): 2551-60.
- Cocucci, E., G. Racchetti, et al. (2009). "Shedding microvesicles: artefacts no more." *Trends Cell Biol* **19**(2): 43-51.
- Cohen, J. I., F. Wang, et al. (1989). "Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(23): 9558-62.
- Cosmopoulos, K., M. Pegtel, et al. (2009). "Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma." *J Virol* **83**(5): 2357-67.
- Dantzer, F., G. de La Rubia, et al. (2000). "Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1." *Biochemistry* **39**(25): 7559-69.
- de-The, G., A. Geser, et al. (1978). "Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study." *Nature* **274**(5673): 756-61.
- de-The, G., M. F. Lavoue, et al. (1978). "Differences in EBV antibody titres of patients with nasopharyngeal carcinoma originating from high, intermediate and low incidence areas." *IARC Sci Publ*(20): 471-81.
- Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-5.
- Dery, C. V., G. de Murcia, et al. (1986). "Possible role of ADP-ribosylation of adenovirus core proteins in virus infection." *Virus Res* **4**(4): 313-29.
- Digby, K. H., W. L. Fook, et al. (1941). "Nasopharyngeal carcinoma." *Br J Surg* **28**: 517-37.

- Dukers, D. F., P. Meij, et al. (2000). "Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1." *J Immunol* **165**(2): 663-70.
- Durkacz, B. W., O. Omidiji, et al. (1980). "(ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair." *Nature* **283**(5747): 593-6.
- Earle, E., A. Saxena, et al. (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase at active centromeres and neocentromeres at metaphase." *Hum Mol Genet* **9**(2): 187-94.
- Edwards, R. H., A. R. Marquitz, et al. (2008). "Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing." *J Virol* **82**(18): 9094-106.
- El-Hefnawy, T., S. Raja, et al. (2004). "Characterization of amplifiable, circulating RNA in plasma and its potential as a tool for cancer diagnostics." *Clin Chem* **50**(3): 564-73.
- Eliopoulos, A. G., N. J. Gallagher, et al. (1999). "Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production." *J Biol Chem* **274**(23): 16085-96.
- Eliopoulos, A. G., M. Stack, et al. (1997). "Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and CD40 mediate IL-6 production in epithelial cells via an NF-kappaB pathway involving TNF receptor-associated factors." *Oncogene* **14**(24): 2899-916.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, et al. (1964). "Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma." *Lancet* **1**(7335): 702-3.
- Fachiroh, J., D. K. Paramita, et al. (2006). "Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening." *J Clin Microbiol* **44**(4): 1459-67.
- Farez, M. F., F. J. Quintana, et al. (2009). "Toll-like receptor 2 and poly(ADP-ribose) polymerase 1 promote central nervous system neuroinflammation in progressive EAE." *Nat Immunol* **10**(9): 958-64.
- Faumont, N., C. Le Clorenec, et al. (2009). "Regulation of DNA polymerase beta by the LMP1 oncoprotein of EBV through the nuclear factor-kappaB pathway." *Cancer Res* **69**(12): 5177-85.
- Feederle, R., M. Kost, et al. (2000). "The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators." *Embo J* **19**(12): 3080-9.
- Feederle, R., S. D. Linnstaedt, et al. (2011). "A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus." *PLoS Pathog* **7**(2): e1001294.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2004). "Cells release prions in association with exosomes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(26): 9683-8.
- Fevrier, B., D. Vilette, et al. (2005). "Exosomes: a bubble ride for prions?" *Traffic* **6**(1): 10-7.
- Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya, et al. (2008). "Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?" *Nat Rev Genet* **9**(2): 102-14.
- Friborg, J., J. Wohlfahrt, et al. (2005). "Cancer susceptibility in nasopharyngeal carcinoma families--a population-based cohort study." *Cancer Res* **65**(18): 8567-72.
- Gatto, G., A. Rossi, et al. (2008). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the NF-kappaB pathway." *Nucleic Acids Res* **36**(20): 6608-19.
- Gaur, A., D. A. Jewell, et al. (2007). "Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines." *Cancer Res* **67**(6): 2456-68.
- Gibbins, D. and O. Voinnet (2010). "Control of RNA silencing and localization by endolysosomes." *Trends Cell Biol* **20**(8): 491-501.
- Gibbins, D. J., C. Ciaudo, et al. (2009). "Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity." *Nat Cell Biol* **11**(9): 1143-9.
- Gires, O., U. Zimmer-Strobl, et al. (1997). "Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule." *Embo J* **16**(20): 6131-40.
- Godshalk, S. E., S. Bhaduri-McIntosh, et al. (2008). "Epstein-Barr virus-mediated dysregulation of human microRNA expression." *Cell Cycle* **7**(22): 3595-600.
- Griffiths-Jones, S. (2004). "The microRNA Registry." *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D109-11.

- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, et al. (2006). "miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature." Nucleic Acids Res **34**(Database issue): D140-4.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, et al. (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D154-8.
- Grishok, A., A. E. Pasquinelli, et al. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." Cell **106**(1): 23-34.
- Gruhne, B., R. Sompallae, et al. (2009). "Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints." Oncogene **28**(45): 3997-4008.
- Grundhoff, A. and C. S. Sullivan (2011). "Virus-encoded microRNAs." Virology **411**(2): 325-43.
- Ha, I., B. Wightman, et al. (1996). "A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation." Genes Dev **10**(23): 3041-50.
- Hammerschmidt, W. and B. Sugden (1989). "Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes." Nature **340**(6232): 393-7.
- Hammond, S. M., E. Bernstein, et al. (2000). "An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells." Nature **404**(6775): 293-6.
- Han, J., J. S. Pedersen, et al. (2009). "Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8." Cell **136**(1): 75-84.
- Harding, C., J. Heuser, et al. (1983). "Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes." J Cell Biol **97**(2): 329-39.
- Heitz, F., P. Harter, et al. (2010). "Poly(ADP-ribosylation) polymerases: mechanism and new target of anticancer therapy." Expert Rev Anticancer Ther **10**(7): 1125-36.
- Henle, G. and W. Henle (1966). "Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma." J Bacteriol **91**(3): 1248-56.
- Henle, W. and G. Henle (1973). "Evidence for an oncogenic potential of the Epstein-Barr virus." Cancer Res **33**(6): 1419-23.
- Henle, W., G. Henle, et al. (1970). "Antibodies to Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma, other head and neck neoplasms, and control groups." J Natl Cancer Inst **44**(1): 225-31.
- Hitt, M. M., M. J. Allday, et al. (1989). "EBV gene expression in an NPC-related tumour." Embo J **8**(9): 2639-51.
- Hjalgrim, H., J. Askling, et al. (2003). "Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis." N Engl J Med **349**(14): 1324-32.
- Ho, H. C., M. H. Ng, et al. (1976). "Epstein-Barr-virus-specific IgA and IgG serum antibodies in nasopharyngeal carcinoma." Br J Cancer **34**(6): 655-60.
- Horikawa, T., T. Yoshizaki, et al. (2011). "Epstein-Barr Virus latent membrane protein 1 induces Snail and epithelial-mesenchymal transition in metastatic nasopharyngeal carcinoma." Br J Cancer.
- Horikawa, T., T. Yoshizaki, et al. (2000). "Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma." Cancer **89**(4): 715-23.
- Huang, D. P., H. C. Ho, et al. (1978). "Presence of EBNA in nasopharyngeal carcinoma and control patient tissues related to EBV serology." Int J Cancer **22**(3): 266-74.
- Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.
- Hurley, J. H. (2008). "ESCRT complexes and the biogenesis of multivesicular bodies." Curr Opin Cell Biol **20**(1): 4-11.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-60.
- Iizasa, H., B. E. Wulff, et al. (2010). "Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency." J Biol Chem **285**(43): 33358-70.

- Ikeda, M. and R. Longnecker (2007). "Cholesterol is critical for Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A trafficking and protein stability." *Virology* **360**(2): 461-8.
- Irion, U. and D. St Johnston (2007). "bicoid RNA localization requires specific binding of an endosomal sorting complex." *Nature* **445**(7127): 554-8.
- Iwakiri, D. and K. Takada (2010). "Role of EBVs in the pathogenesis of EBV infection." *Adv Cancer Res* **107**: 119-36.
- Jackson, C. (1901). "Primary carcinoma of the nasopharynx: a table of cases." *JAMA* **37**: 371-77.
- Jahr, S., H. Hentze, et al. (2001). "DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells." *Cancer Res* **61**(4): 1659-65.
- Jakymiw, A., K. M. Pauley, et al. (2007). "The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing." *J Cell Sci* **120**(Pt 8): 1317-23.
- Jeong, H. C., E. K. Kim, et al. (2011). "Aberrant expression of let-7a miRNA in the blood of non-small cell lung cancer patients." *Mol Med Report* **4**(2): 383-7.
- Ji, M. F., D. K. Wang, et al. (2007). "Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma." *Br J Cancer* **96**(4): 623-30.
- Ji, Y. and A. V. Tulin (2010). "The roles of PARP1 in gene control and cell differentiation." *Curr Opin Genet Dev* **20**(5): 512-8.
- Johnson, S. M., H. Grosshans, et al. (2005). "RAS is regulated by the let-7 microRNA family." *Cell* **120**(5): 635-47.
- Johnstone, R. M. (2006). "Exosomes biological significance: A concise review." *Blood Cells Mol Dis* **36**(2): 315-21.
- Kannan, S., W. Fang, et al. (2011). "Notch/HES1-mediated PARP1 activation: a cell type-specific mechanism for tumor suppression." *Blood* **117**(10): 2891-900.
- Kaye, K. M., K. M. Izumi, et al. (1993). "Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19): 9150-4.
- Kennedy, G., J. Komano, et al. (2003). "Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(24): 14269-74.
- Keryer-Bibens, C., C. Pioche-Durieu, et al. (2006). "Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9." *BMC Cancer* **6**: 283.
- Ketting, R. F., S. E. Fischer, et al. (2001). "Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*." *Genes Dev* **15**(20): 2654-9.
- Khabir, A., H. Karray, et al. (2005). "EBV latent membrane protein 1 abundance correlates with patient age but not with metastatic behavior in north African nasopharyngeal carcinomas." *Virology* **339**: 39.
- Khabir, A., A. Sellami, et al. (2000). "Contrasted frequencies of p53 accumulation in the two age groups of North African nasopharyngeal carcinomas." *Clin Cancer Res* **6**(10): 3932-6.
- Kilger, E., A. Kieser, et al. (1998). "Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor." *Embo J* **17**(6): 1700-9.
- Kim do, N., H. S. Chae, et al. (2007). "Expression of viral microRNAs in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma." *J Virol* **81**(2): 1033-6.
- Kim, V. N., J. Han, et al. (2009). "Biogenesis of small RNAs in animals." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(2): 126-39.
- Klibi, J., T. Niki, et al. (2009). "Blood diffusion and Th1-suppressive effects of galectin-9-containing exosomes released by Epstein-Barr virus-infected nasopharyngeal carcinoma cells." *Blood* **113**(9): 1957-66.
- Kluiver, J., E. Haralambieva, et al. (2006). "Lack of BIC and microRNA miR-155 expression in primary cases of Burkitt lymphoma." *Genes Chromosomes Cancer* **45**(2): 147-53.
- Knight, S. W. and B. L. Bass (2001). "A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **293**(5538): 2269-71.
- Koh, D. W., T. M. Dawson, et al. (2005). "Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1." *Pharmacol Res* **52**(1): 5-14.

- Kotova, E., M. Jarnik, et al. (2009). "Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is required for protein localization to Cajal body." *PLoS Genet* **5**(2): e1000387.
- Kraus, W. L. (2008). "Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation." *Curr Opin Cell Biol* **20**(3): 294-302.
- Kroh, E. M., R. K. Parkin, et al. "Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)." *Methods* **50**(4): 298-301.
- Kumar, M. S., J. Lu, et al. (2007). "Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis." *Nat Genet* **39**(5): 673-7.
- Kumar, M. S., R. E. Pester, et al. (2009). "Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor." *Genes Dev* **23**(23): 2700-4.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2001). "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs." *Science* **294**(5543): 853-8.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, et al. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol* **12**(9): 735-9.
- Lai, E. C. (2002). "Micro RNAs are complementary to 3' UTR sequence motifs that mediate negative post-transcriptional regulation." *Nat Genet* **30**(4): 363-4.
- Lal, A., F. Navarro, et al. (2009). "miR-24 Inhibits cell proliferation by targeting E2F2, MYC, and other cell-cycle genes via binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements." *Mol Cell* **35**(5): 610-25.
- Langelier, M. F., D. D. Ruhl, et al. "The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction." *J Biol Chem* **285**(24): 18877-87.
- Lau, N. C., L. P. Lim, et al. (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 858-62.
- Lee, R. C. and V. Ambros (2001). "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*." *Science* **294**(5543): 862-4.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* **75**(5): 843-54.
- Lee, T. H., E. D'Asti, et al. (2011). "Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer-the emerging science of cellular 'debris'." *Semin Immunopathol*.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature* **425**(6956): 415-9.
- Lee, Y., K. Jeon, et al. (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." *Embo J* **21**(17): 4663-70.
- Lesnik, P., A. Vonica, et al. (1993). "Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a)." *Arterioscler Thromb* **13**(7): 1066-75.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, et al. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." *Cell* **115**(7): 787-98.
- Lim, L. P., M. E. Glasner, et al. (2003). "Vertebrate microRNA genes." *Science* **299**(5612): 1540.
- Lim, L. P., N. C. Lau, et al. (2003). "The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*." *Genes Dev* **17**(8): 991-1008.
- Lin, J. C., W. Y. Wang, et al. (2004). "Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma." *N Engl J Med* **350**(24): 2461-70.
- Lo, A. K., K. F. To, et al. (2007). "Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(41): 16164-9.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science* **303**(5654): 95-8.
- Lung, R. W., J. H. Tong, et al. (2009). "Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22." *Neoplasia* **11**(11): 1174-84.
- Luzuriaga, K. and J. L. Sullivan (2010). "Infectious mononucleosis." *N Engl J Med* **362**(21): 1993-2000.

- Ma, N., M. Kawanishi, et al. (2008). "Reactive nitrogen species-dependent DNA damage in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma: the relation to STAT3 activation and EGFR expression." *Int J Cancer* **122**(11): 2517-25.
- MacRae, I. J., K. Zhou, et al. (2007). "Structural determinants of RNA recognition and cleavage by Dicer." *Nat Struct Mol Biol* **14**(10): 934-40.
- Mandel, P. and P. Metais (1948). "Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme." *C R Seances Soc Biol Fil* **142**(3-4): 241-3.
- Manet, E., H. Gruffat, et al. (1989). "Epstein-Barr virus bicistronic mRNAs generated by facultative splicing code for two transcriptional trans-activators." *Embo J* **8**(6): 1819-26.
- Maruo, S., B. Zhao, et al. (2011). "Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16INK4A and p14ARF expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(5): 1919-24.
- Masutani, M., H. Nakagama, et al. (2005). "Poly(ADP-ribosyl)ation in relation to cancer and autoimmune disease." *Cell Mol Life Sci* **62**(7-8): 769-83.
- Meyer-Ficca, M. L., R. G. Meyer, et al. (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerases: managing genome stability." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(5): 920-6.
- Meyer, R., M. Muller, et al. (2000). "Negative regulation of alkylation-induced sister-chromatid exchange by poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity." *Int J Cancer* **88**(3): 351-5.
- Michael, A., S. D. Bajracharya, et al. "Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers." *Oral Dis* **16**(1): 34-8.
- Miller, G. (1974). "The oncogenicity of Epstein-Barr virus." *J Infect Dis* **130**(2): 187-205.
- Miller, G., J. C. Niederman, et al. (1973). "Prolonged oropharyngeal excretion of Epstein-Barr virus after infectious mononucleosis." *N Engl J Med* **288**(5): 229-32.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-8.
- Miyoshi, K., T. Miyoshi, et al. (2010). "Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production." *Mol Genet Genomics* **284**(2): 95-103.
- Monteys, A. M., R. M. Spengler, et al. (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." *Rna* **16**(3): 495-505.
- Mosialos, G., M. Birkenbach, et al. (1995). "The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family." *Cell* **80**(3): 389-99.
- Motsch, N., T. Pfuhl, et al. (2007). "Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) induces the expression of the cellular microRNA miR-146a." *RNA Biol* **4**(3): 131-7.
- Muthumani, K., A. Y. Choo, et al. (2006). "The HIV-1 Vpr and glucocorticoid receptor complex is a gain-of-function interaction that prevents the nuclear localization of PARP-1." *Nat Cell Biol* **8**(2): 170-9.
- Mutirangura, A., W. Pornthanakasem, et al. (1998). "Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma." *Clin Cancer Res* **4**(3): 665-9.
- Nadkarni, J. S., J. J. Nadkarni, et al. (1969). "Characteristics of new cell lines derived from Burkitt lymphomas." *Cancer* **23**(1): 64-79.
- Nanbo, A., K. Inoue, et al. (2002). "Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma." *Embo J* **21**(5): 954-65.
- Nayyar, V. K., K. Shire, et al. (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.
- New, G. B. (1922). "Syndrome of malignant tumors of the nasopharynx, a report of seventy-nine cases." *JAMA* **79**: 10-14.
- Ogino, H., T. Nozaki, et al. (2007). "Loss of Parp-1 affects gene expression profile in a genome-wide manner in ES cells and liver cells." *BMC Genomics* **8**: 41.
- Ohsaki, E., K. Ueda, et al. (2004). "Poly(ADP-ribose) polymerase 1 binds to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) terminal repeat sequence and modulates KSHV replication in latency." *J Virol* **78**(18): 9936-46.

- Old, L. J., E. A. Boyse, et al. (1966). "Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured burkitt's lymphoma cells." Proc Natl Acad Sci U S A **56**(6): 1699-704.
- Ozsolak, F., L. L. Poling, et al. (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." Genes Dev **22**(22): 3172-83.
- Pan, B. T., K. Teng, et al. (1985). "Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes." J Cell Biol **101**(3): 942-8.
- Parent, M., T. M. Yung, et al. (2005). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1 is a negative regulator of HIV-1 transcription through competitive binding to TAR RNA with Tat-positive transcription elongation factor b (p-TEFb) complex." J Biol Chem **280**(1): 448-57.
- Parker, G. A., T. Crook, et al. (1996). "Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7." Oncogene **13**(12): 2541-9.
- Parker, G. A., R. Touitou, et al. (2000). "Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis." Oncogene **19**(5): 700-9.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, et al. (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-9.
- Pathmanathan, R., U. Prasad, et al. (1995). "Clonal proliferations of cells infected with Epstein-Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma." N Engl J Med **333**(11): 693-8.
- Pederson, T. (2010). "Regulatory RNAs derived from transfer RNA?" Rna **16**(10): 1865-9.
- Pegtel, D. M., K. Cosmopoulos, et al. (2010). "Functional delivery of viral miRNAs via exosomes." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(14): 6328-33.
- Pfeffer, S., M. Zavolan, et al. (2004). "Identification of virus-encoded microRNAs." Science **304**(5671): 734-6.
- Pisitkun, T., R. F. Shen, et al. (2004). "Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(36): 13368-73.
- Poirier, S., G. Bouvier, et al. (1989). "Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation." Int J Cancer **44**(6): 1088-94.
- Pratt, Z. L., M. Kuzembayeva, et al. (2009). "The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines." Virology **386**(2): 387-97.
- Raab-Traub, N. (2007). EBV-induced oncogenesis. Human Herpesviruses : Biology, Therapy and Immunoprophylaxis. A. C.-F. Arvin, G. Mocarski, E. Moore, P. S. Roizman, B. Whitley, R. Yamanishi, K. Cambridge, University Press.
- Raab-Traub, N. and K. Flynn (1986). "The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation." Cell **47**(6): 883-9.
- Rabinowits, G., C. Gercel-Taylor, et al. (2009). "Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer." Clin Lung Cancer **10**(1): 42-6.
- Raposo, G., H. W. Nijman, et al. (1996). "B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles." J Exp Med **183**(3): 1161-72.
- Reese, T. A., J. Xia, et al. (2010). "Identification of novel microRNA-like molecules generated from herpesvirus and host tRNA transcripts." J Virol **84**(19): 10344-53.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, et al. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-6.
- Robertson, E. S., S. Grossman, et al. (1995). "Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa." J Virol **69**(5): 3108-16.
- Robertson, E. S., B. Tomkinson, et al. (1994). "An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro." J Virol **68**(3): 1449-58.
- Roughan, J. E. and D. A. Thorley-Lawson (2009). "The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center." J Virol **83**(8): 3968-76.
- Roughan, J. E., C. Torgbor, et al. (2010). "Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number." J Virol **84**(2): 1158-68.

- Rowe, M., G. L. Kelly, et al. (2009). "Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology." *Semin Cancer Biol* **19**(6): 377-88.
- Ruf, I. K., P. W. Rhyne, et al. (2000). "Epstein-Barr virus small RNAs potentiate tumorigenicity of Burkitt lymphoma cells independently of an effect on apoptosis." *J Virol* **74**(21): 10223-8.
- Saemundsen, A. K., H. Albeck, et al. (1982). "Epstein-Barr virus in nasopharyngeal and salivary gland carcinomas of Greenland Eskimo." *Br J Cancer* **46**(5): 721-8.
- Sam, C. K., U. Prasad, et al. (1989). "Serological markers in the diagnosis of histopathological types of nasopharyngeal carcinoma." *Eur J Surg Oncol* **15**(4): 357-60.
- Saxena, A., R. Saffery, et al. (2002). "Centromere proteins Cenpa, Cenpb, and Bub3 interact with poly(ADP-ribose) polymerase-1 protein and are poly(ADP-ribosyl)ated." *J Biol Chem* **277**(30): 26921-6.
- Saxena, S., Z. O. Jonsson, et al. (2003). "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells." *J Biol Chem* **278**(45): 44312-9.
- Sbih-Lammali, F., B. Clausse, et al. (1999). "Control of apoptosis in Epstein Barr virus-positive nasopharyngeal carcinoma cells: opposite effects of CD95 and CD40 stimulation." *Cancer Res* **59**(4): 924-30.
- Schorey, J. S. and S. Bhatnagar (2008). "Exosome function: from tumor immunology to pathogen biology." *Traffic* **9**(6): 871-81.
- Schreiber, V., F. Dantzer, et al. (2006). "Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 517-28.
- Sears, J., M. Ujihara, et al. (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.
- Selbach, M., B. Schwanhauser, et al. (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." *Nature* **455**(7209): 58-63.
- Shall, S. and G. de Murcia (2000). "Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model?" *Mutat Res* **460**(1): 1-15.
- Shibata, D., M. Tokunaga, et al. (1991). "Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma." *Am J Pathol* **139**(3): 469-74.
- Shotelersuk, K., C. Khorprasert, et al. (2000). "Epstein-Barr virus DNA in serum/plasma as a tumor marker for nasopharyngeal cancer." *Clin Cancer Res* **6**(3): 1046-51.
- Silverman, J. M. and N. E. Reiner (2011). "Exosomes and other microvesicles in infection biology: organelles with unanticipated phenotypes." *Cell Microbiol* **13**(1): 1-9.
- Simons, M. and G. Raposo (2009). "Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication." *Curr Opin Cell Biol* **21**(4): 575-81.
- Simpson, R. J., S. S. Jensen, et al. (2008). "Proteomic profiling of exosomes: current perspectives." *Proteomics* **8**(19): 4083-99.
- Sixbey, J. W., J. G. Nedrud, et al. (1984). "Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells." *N Engl J Med* **310**(19): 1225-30.
- Skog, J., T. Wurdinger, et al. (2008). "Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers." *Nat Cell Biol* **10**(12): 1470-6.
- Stevens, S. J., S. A. Verkuijlen, et al. (2006). "Noninvasive diagnosis of nasopharyngeal carcinoma: nasopharyngeal brushings reveal high Epstein-Barr virus DNA load and carcinoma-specific viral BART1 mRNA." *Int J Cancer* **119**(3): 608-14.
- Su, I. J., K. H. Lin, et al. (1990). "Epstein-Barr virus-associated peripheral T-cell lymphoma of activated CD8 phenotype." *Cancer* **66**(12): 2557-62.
- Takada, K. and A. Nanbo (2001). "The role of EBERS in oncogenesis." *Semin Cancer Biol* **11**(6): 461-7.

- Tam, W., D. Ben-Yehuda, et al. (1997). "bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA." Mol Cell Biol **17**(3): 1490-502.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." Gynecol Oncol **110**(1): 13-21.
- Tempera, I., Z. Deng, et al. (2010). "Regulation of Epstein-Barr virus OriP replication by poly(ADP-ribose) polymerase 1." J Virol **84**(10): 4988-97.
- Thery, C., M. Bousnac, et al. (2001). "Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles." J Immunol **166**(12): 7309-18.
- Thery, C., M. Ostrowski, et al. (2009). "Membrane vesicles as conveyors of immune responses." Nat Rev Immunol **9**(8): 581-93.
- Tomkinson, B., E. Robertson, et al. (1993). "Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation." J Virol **67**(4): 2014-25.
- Tomkinson, B., E. Robertson, et al. (1993). "Epstein-Barr virus recombinants from overlapping cosmid fragments." J Virol **67**(12): 7298-306.
- Trajkovic, K., C. Hsu, et al. (2008). "Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes." Science **319**(5867): 1244-7.
- Turchinovich, A., L. Weiz, et al. (2011). "Characterization of extracellular circulating microRNA." Nucleic Acids Res.
- Tuschl, T., P. D. Zamore, et al. (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." Genes Dev **13**(24): 3191-7.
- Uchida, J., T. Yasui, et al. (1999). "Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses." Science **286**(5438): 300-3.
- Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." Nat Cell Biol **9**(6): 654-9.
- van der Gun, B. T., L. J. Melchers, et al. (2010). "EpCAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly." Carcinogenesis **31**(11): 1913-21.
- van Niel, G., I. Porto-Carreiro, et al. (2006). "Exosomes: a common pathway for a specialized function." J Biochem **140**(1): 13-21.
- van Niel, G., G. Raposo, et al. (2001). "Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles." Gastroenterology **121**(2): 337-49.
- Verweij, F. J., M. A. van Eijndhoven, et al. (2011). "LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-kappaB activation." Embo J **30**(11): 2115-29.
- Vickers, K. C., B. T. Palmisano, et al. (2011). "MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins." Nat Cell Biol **13**(4): 423-33.
- Walz, N., T. Christalla, et al. (2010). "A global analysis of evolutionary conservation among known and predicted gammaherpesvirus microRNAs." J Virol **84**(2): 716-28.
- Wang, D., D. Liebowitz, et al. (1985). "An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells." Cell **43**(3 Pt 2): 831-40.
- Wang, K., S. Zhang, et al. (2010). "Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells." Nucleic Acids Res **38**(20): 7248-59.
- Wang, W. Y., C. W. Twu, et al. (2010). "Plasma EBV DNA clearance rate as a novel prognostic marker for metastatic/recurrent nasopharyngeal carcinoma." Clin Cancer Res **16**(3): 1016-24.
- Wang, X., Z. Xuan, et al. (2009). "High-resolution human core-promoter prediction with CoreBoost\_HM." Genome Res **19**(2): 266-75.
- Wang, Z. Q., B. Auer, et al. (1995). "Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease." Genes Dev **9**(5): 509-20.
- Wei, W. I. and J. S. Sham (2005). "Nasopharyngeal carcinoma." Lancet **365**(9476): 2041-54.
- Weiss, L. M., L. A. Movahed, et al. (1989). "Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease." N Engl J Med **320**(8): 502-6.

- Wightman, B., T. R. Burglin, et al. (1991). "Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development." Genes Dev **5**(10): 1813-24.
- Wilson, J. B., J. L. Bell, et al. (1996). "Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice." Embo J **15**(12): 3117-26.
- Winter, J., S. Jung, et al. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." Nat Cell Biol **11**(3): 228-34.
- Wolf, H., M. Haus, et al. (1984). "Persistence of Epstein-Barr virus in the parotid gland." J Virol **51**(3): 795-8.
- Wolf, H., H. zur Hausen, et al. (1973). "EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells." Nat New Biol **244**(138): 245-7.
- Wong, A. M., K. L. Kong, et al. (2011). "Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs." Cancer.
- Xia, T., A. O'Hara, et al. (2008). "EBV microRNAs in primary lymphomas and targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3." Cancer Res **68**(5): 1436-42.
- Yao, Y., H. A. Minter, et al. (2000). "Heterogeneity of HLA and EBER expression in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma." Int J Cancer **88**(6): 949-55.
- Yeom, K. H., Y. Lee, et al. (2006). "Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing." Nucleic Acids Res **34**(16): 4622-9.
- Yin, Q., J. McBride, et al. (2008). "MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways." J Virol **82**(11): 5295-306.
- Young, L. S. (2005). "The role of Epstein-Barr virus infection in human malignancies." haematologica reports **1**(5): 8-14.
- Young, L. S. and A. B. Rickinson (2004). "Epstein-Barr virus: 40 years on." Nat Rev Cancer **4**(10): 757-68.
- Yu, K. J., W. L. Hsu, et al. (2011). "Prognostic utility of anti-EBV antibody testing for defining NPC risk among individuals from high-risk NPC families." Clin Cancer Res **17**(7): 1906-14.
- Yu, X., S. L. Harris, et al. (2006). "The regulation of exosome secretion: a novel function of the p53 protein." Cancer Res **66**(9): 4795-801.
- Zeng, Y. and B. R. Cullen (2005). "Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences." J Biol Chem **280**(30): 27595-603.
- Zeng, Y., R. Yi, et al. (2005). "Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha." Embo J **24**(1): 138-48.
- Zhang, Z., E. F. Hildebrandt, et al. (2002). "Sequence-specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the human T cell leukemia virus type-I tax responsive element." Virology **296**(1): 107-16.
- Zhu, J. Y., T. Pfuhl, et al. (2009). "Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas." J Virol **83**(7): 3333-41.
- Zitvogel, L., A. Regnault, et al. (1998). "Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes." Nat Med **4**(5): 594-600.
- zur Hausen, H., H. Schulte-Holthausen, et al. (1970). "EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx." Nature **228**(5276): 1056-8.

# **ANNEXES**

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells

Luc Friboulet<sup>1</sup>, Claire Gourzones<sup>1</sup>, Sai Wah Tsao<sup>2</sup>, Yannis Morel<sup>3</sup>, Carine Paturel<sup>3</sup>, Stéphane Témmam<sup>4</sup>, Catherine Uzan<sup>5</sup> and Pierre Busson\*<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** There is increasing evidence that the toll-like receptor 3 (TLR3) is an interesting target for anti-cancer therapy. Unfortunately, most laboratory investigations about the impact of TLR3 stimulation on human malignant cells have been performed with very high concentrations - 5 to 100 µg/ml - of the prototype TLR3 ligand, poly(I:C). In a previous study focused on a specific type of human carcinoma - nasopharyngeal carcinoma - we have shown that concentrations of poly(I:C) as low as 100 ng/ml are sufficient to induce apoptosis of malignant cells when combined to a pharmacological antagonist of the IAP family based on Smac mimicry.

**Methods:** This observation prompted us to investigate the contribution of the IAP family in cell response to poly(I:C) in a variety of human malignant cell types.

**Results:** We report a rapid, intense and selective increase in c-IAP2 protein expression observed under stimulation by poly(I:C) (500 ng/ml) in all types of human malignant cells. In most cell types, this change in protein expression is underlain by an increase in c-IAP2 transcripts and dependent on the TLR3/TRIF pathway. When poly(I:C) is combined to the IAP inhibitor RMT 5265, a cooperative effect in apoptosis induction and/or inhibition of clonogenic growth is obtained in a large fraction of carcinoma and melanoma cell lines.

**Conclusions:** Currently, IAP inhibitors like RMT 5265 and poly(I:C) are the subject of separate therapeutic trials. In light of our observations, combined use of both types of compounds should be considered for treatment of human malignancies including carcinomas and melanomas.

## Background

Toll-like receptor 3, a membrane receptor of double strand RNAs, is a major effector of the immune response against viral pathogens at the cellular and systemic level. It is involved in early activation of NK and dendritic cells. It is also expressed in a wide range of non-immune cells where it plays a key role in the induction of interferon response [1]. TLR3 is frequently expressed by malignant cells of various types and there are several observations suggesting that it can be targeted for therapeutic purpose [2,3]. At least one clinical trial has shown a therapeutic benefit for breast carcinoma patients treated with the

synthetic TLR3 agonist poly(A/U) [4]. On the other hand, several *in vitro* studies have reported apoptosis induction in malignant cells treated with the synthetic TLR3-agonist, poly(I:C). However, these results were obtained using very high concentrations of this agent in the range of 10 to 100 µg/ml [5-9]. Such concentrations are probably incompatible with doses of synthetic ligands acceptable for patient treatment. One of our previous study focused on nasopharyngeal carcinoma has opened new perspectives in this field [10]. Nasopharyngeal carcinoma or NPC is a human epithelial tumor whose malignant cells are latently infected by the Epstein-Barr virus (EBV). Using our experimental model of NPC, we could demonstrate that massive caspase-dependent apoptosis was induced in NPC cells by poly(I:C) at a low concentration (500 ng/ml) when it was combined to RMT 5265 (100

\* Correspondence: pbusson@igr.fr

<sup>1</sup> Univ Paris-Sud, CNRS-UMR 8126 and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif, France  
Full list of author information is available at the end of the article

nM), a synthetic inhibitor of the IAP family of proteins [10].

Inhibitor of apoptosis proteins (IAP) are a class of regulatory proteins, with mainly anti-apoptotic properties, characterized by the presence of one to three domains known as baculoviral IAP repeat (BIR) domains [11]. Among these IAP proteins, X-linked IAP (XIAP) is a direct inhibitor of caspase activity. It is produced in large amounts in all cell types and is often regarded as a house-keeping protein [11]. Cellular IAP-1 (cIAP-1) and cIAP-2 have more complex regulatory functions, many of these functions involving their E3 ubiquitin-ligase activity [12-14]. Recent studies have emphasized their connection with TNF-receptor signaling and NF- $\kappa$ B activation [14-16]. They are expressed at various levels in cancer cells depending on the tumor type [10]. Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) is an endogenous antagonist of IAP protein [17]. In its dimeric form, Smac, via its AVPI tetrapeptide binding motif, binds the BIR domains of XIAP, c-IAP1 and 2. It causes proteasome-dependent degradation of c-IAP1 and c-IAP2 [17]. RMT 5265 is the prototype of a new class of anticancer drugs called Smac mimetics [18]. This polycyclic compound was designed for spatial mimicry of the AVPI motif of the Smac protein. It is cell permeable and specifically binds c-IAP1, c-IAP2 and XIAP, triggering rapid proteasome-dependent degradation of c-IAP1 and c-IAP2 [10,18]. It is also suspected to antagonize the functions of XIAP [18].

Our previous study on NPC cells provided the proof of principle 1) that synthetic TLR3 ligands could be active on malignant cells at much lower concentrations than previously reported (below 1  $\mu$ g/ml); 2) that the IAP family of proteins was very important to modulate cell response to TLR3 stimulation and 3) that combinations of TLR3 ligands with IAP inhibitors were susceptible to provide a therapeutic benefit [10]. However NPC cells have unique biological features, for example a low frequency of p53 mutations, in addition to a latent EBV-infection in virtually 100% of the cases [19]. Therefore, it was important to investigate the role of IAPs in other types of malignant cells subjected to TLR3 stimulation. Using a panel of various human carcinoma and melanoma cell lines, we decided to address the following questions: 1) What is the influence of a TLR3 synthetic ligand on the status of the IAP proteins? 2) Can we enhance the pro-apoptotic effect of a TLR3 ligand by combination with an IAP inhibitor?

We report that the basal concentration of c-IAP2 is at a low level in a majority of malignant cell types, in contrast with our previous observations in NPC cells. However, stimulation of TLR3 by the synthetic ligand poly(I:C) induces a rapid, substantial and specific increase in c-IAP2 protein content, in all malignant cells tested. This increase is, at least to a large extent, explained by a tran-

scriptional effect. When poly(I:C) was combined with the IAP inhibitor RMT 5265, we observed a cooperative effect in apoptosis induction and/or inhibition of clonogenic growth in a wide range of cancer cells.

## Methods

### Cell lines

The following malignant cell lines were used: HeLa (epithelial, cervix carcinoma); T1, SK29 and Rosi (melanomas); SKOV3 and IGR-OV1 (ovarian carcinomas); LNCaP (prostatic carcinoma) [16,20]. MRC5 cells are non-malignant human fibroblasts purchased from Biomerieux (Marcy l'Etoile, France). The NP69 cell line was obtained by SV40 infection of epithelial cells derived from a piece of non-malignant human nasopharyngeal mucosa [21]. NP69 cells were grown in KGF keratinocyte medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). LNCaP, SK29, Rosi, IGR-OV1 and MRC5 cells were continuously grown in RPMI 1640 medium (Gibco-Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% FCS, SKOV3 cells were grown in Mc Coy's 5A medium (Gibco-Invitrogen) supplemented with 10% FCS and 2% sodium bicarbonate, T1 cells in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS and 1% sodium pyruvate and HeLa cells in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen) supplemented with 5% FCS.

### Preparation of cell suspensions from tumor biopsies

Fragments of tumor biopsies were obtained after written informed consent from two patients treated at the Institut de Cancérologie Gustave Roussy (Villejuif, France). Patient A, male, aged 42, had a well differentiated squamous cell carcinoma of the larynx, staged T2N0M0. Patient B, male, aged 52 had a differentiated squamous cell carcinoma of the oral cavity staged T4N2bM0. A few minutes after collection, these tumor fragments were minced in small pieces (1 to 2 mm diameter) and incubated sequentially 1) in a solution of trypsin (1.25 mg/ml)(Sigma, St Quentin Fallavier, France) in DPBS (Dulbecco Phosphate Buffered Saline - Invitrogen) at 4°C for 90 min with agitation; 2) then in a solution of collagenase (4 mg/ml)(type 2, Worthington) and DNase (10  $\mu$ g/ml)(Sigma) in RPMI culture medium with 20% fetal calf serum at 37°C for 3 hours. Tumor cells were then dispersed by energetic pipet aspirations and releases, washed, filtered through a 70  $\mu$ m cell strainer, counted and seeded in 24-well culture plates at a density of 0.5 million/well.

### Treatments of cells with pharmacological reagents

The polycyclic C2-symmetric (40 carbon atoms) compound RMT 5265, which mimics the three-dimensional structure of the Smac/Diablo N-terminal tetrapeptide, has been previously described [18]. HS4044 or control

agent, has a similar structure but is acetylated at a critical alanine group; it was used as a negative control [18]. Both reagents were dissolved in DMSO. Agonists of TLR3 (poly(I:C)) and TLR9 (type C CpG) were obtained from InvivoGen (Toulouse, France). Bafilomycin A1 (endosomal acidification inhibitor) and 2-Aminopurine (PKR inhibitor) were purchased from Sigma.

#### RNA interference

Expression of proteins was knocked down using the following siRNA: TRIF (TICAM1) (1: HSS152364; 2: HSS152365; 3: HSS175528), TLR3 (1: HSS110815; 2: HSS110817), c-IAP2 (HSS100561), XIAP (HSS100565). These siRNA and a negative control (NS; ref. 1390109) were purchased from Invitrogen. Transfections were carried out using Oligofectamine (Invitrogen). The final concentration of siRNAs in the culture medium was 100 nM for 4 h and 50 nM for the next 44 h. The impact on protein expression was assessed by western blotting, 48 h or 72 h after the initiation of transfection.

#### RNA extraction, reverse transcription and polymerase reaction

Total RNA was extracted from cultured cells with the RNeasy extraction kit (Qiagen, Valencia, CA). Total RNA (1 µg) was reverse-transcribed using the Protoscript First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA). Real-time PCR was performed in a 25 µl reaction volume, containing 25 ng of cDNA template, 10 pmol of each primer and 12.5 µl of TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). The following sets of primers and probes were purchased from Applied Biosystems (TaqMan Gene Expression system): BIRC3 (HS00154109\_m1), TLR3 (HS01551078\_m1), TLR4 (HS00152939\_m1), TLR9 (HS00370913\_s1), and GAPDH (HS99999905\_m1). Amplification reactions were performed in an Applied Biosystems Abi Prism 7000 Sequence Detection System. Data from RQ-PCR were analysed using the comparative CT method with GAPDH as an endogenous reference.

#### Cell Growth Assays

Clonogenic growth of various cell types was assessed by plating cells at low density in six well plates. Initial cell densities were established for each cell type on the basis of pilot experiments varying from 2000 (NP69) to 5000 (others cell types) per well in six well plates. After 2 to 4 weeks of culture, cell colonies were stained with a solution of crystal violet. Dried plates were then scanned and digitized to allow optical magnification and precise counting of cell colonies.

#### Assessment of Apoptosis and Caspase Activation

Apoptosis was assessed quantitatively by determining the sub-G1 DNA content in ethanol-fixed cells, stained with

propidium iodide and analyzed using a Becton Dickinson FACScalibur flow cytometer and the CellQuest Pro software. Alternatively, apoptosis was evaluated by the detection of the cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) by western blot analysis performed on total cell protein extracts. The activities of caspases-3/7 and caspase-8 were measured with the Caspases-Glo 3/7 and Caspases-Glo 8 Assay kits, respectively (Promega, Lyon, France). These assays are based on the cleavage of luminescent substrates containing the amino-acid sequences Z-DEVD and Z-LETD, respectively.

#### Cell protein extraction and western blot analysis

Proteins from cultured cells were extracted by lysis in RIPA buffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% sodium DOC, 0.5% NP40, 0.1% SDS) supplemented with a protease inhibitor cocktail (Complete, Roche, Meylan, France). They were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes (Immobilon, Millipore, Billerica, CA) by electroblotting at 4°C for 90 minutes at 90 V or overnight at 45 V. The antibodies used for western blotting were mouse monoclonal antibodies directed against human c-IAP2, XIAP and c-IAP1, obtained from BD Biosciences (reference 552782, 610763 and 556533, respectively; Le Pont de Claix, France). The other mouse monoclonal antibodies used were specific for FLICE-like inhibitory protein (FLIP) (Alexis Biochemical, ref. 804-428; San Diego, CA), PARP (Santa Cruz Biotechnology; ref. 53643; Heidelberg, Germany), TRIF (Cell Signalling, ref. 4596; Danvers, MA), caspase-8 (Cell Signaling, ref. 9746), TLR3 (R&D systems ref. MAB1487; Lille, France), β-actin (Millipore, Billerica, CA, ref. MAB1501) and tubulin-α (Sigma, ref. T5168). Blots were incubated with a secondary peroxidase-conjugated antibody and chemiluminescent detection was done using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, Billerica, CA).

#### Statistics

Results of real-time PCR, colony assays and caspase assays were given as the means +/- standard deviation (SD). Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t test for comparison of 2 experimental conditions. When making comparisons involving multiple experimental conditions we used the ANOVA test completed by the Tukey test (bilateral) in the XLSTAT software (confidence interval 95%).

#### Results

##### TLR3 transcripts are constitutively expressed in various types of human malignant cells

TLR3 expression has been reported in a wide range of human malignant cells [5,6,8]. To confirm this observation, TLR3 messenger RNAs were analyzed by quantita-

tive RT-PCR in a series of human malignant cell lines including one melanoma (T1), two ovarian carcinomas (IGR-OV1 and SKOV3), one endocervical carcinoma (HeLa), one prostate carcinoma (LNCaP). Two human control cell lines were analyzed in parallel: a human diploid fibroblast cell line (MRC5) and an SV40-immortalized non-tumorigenic cell line derived from human nasopharyngeal epithelial cells (NP69). As shown in Figure 1A, transcripts of TLR3 were readily detected in all 5 malignant cell lines at a higher level than in non-tumorigenic MRC5 and NP69 cells. The distribution of TLR4 and 9 transcripts was quite different. There were homogeneous high levels of TLR9 transcripts in tumorigenic and non-tumorigenic cells and a more restricted expression of TLR4 with high levels in T1 and NP69 cells. In some experimental systems, double strand RNA has been shown to induce a positive feed-back on TLR3 expression [22]. We investigated whether the same positive feed-back mechanism could happen in our cell lines under treatment by poly(I:C) at 500 ng/ml for 16 h. As shown in Figure 1B, we observed almost no changes in TLR4 and TLR9 transcript levels. In contrast, TLR3 expression was enhanced more than 2 fold in 4 of the 5 malignant cell lines and only slightly modified in MRC5 and NP69. The increase in TLR3 messenger RNAs resulted in an increase in protein expression as shown in Figure 1C. In summary, TLR3 transcripts are abundant and highly inducible in various types of human malignant cells whereas they are at a low level and not inducible in two different types of human non-malignant cells.

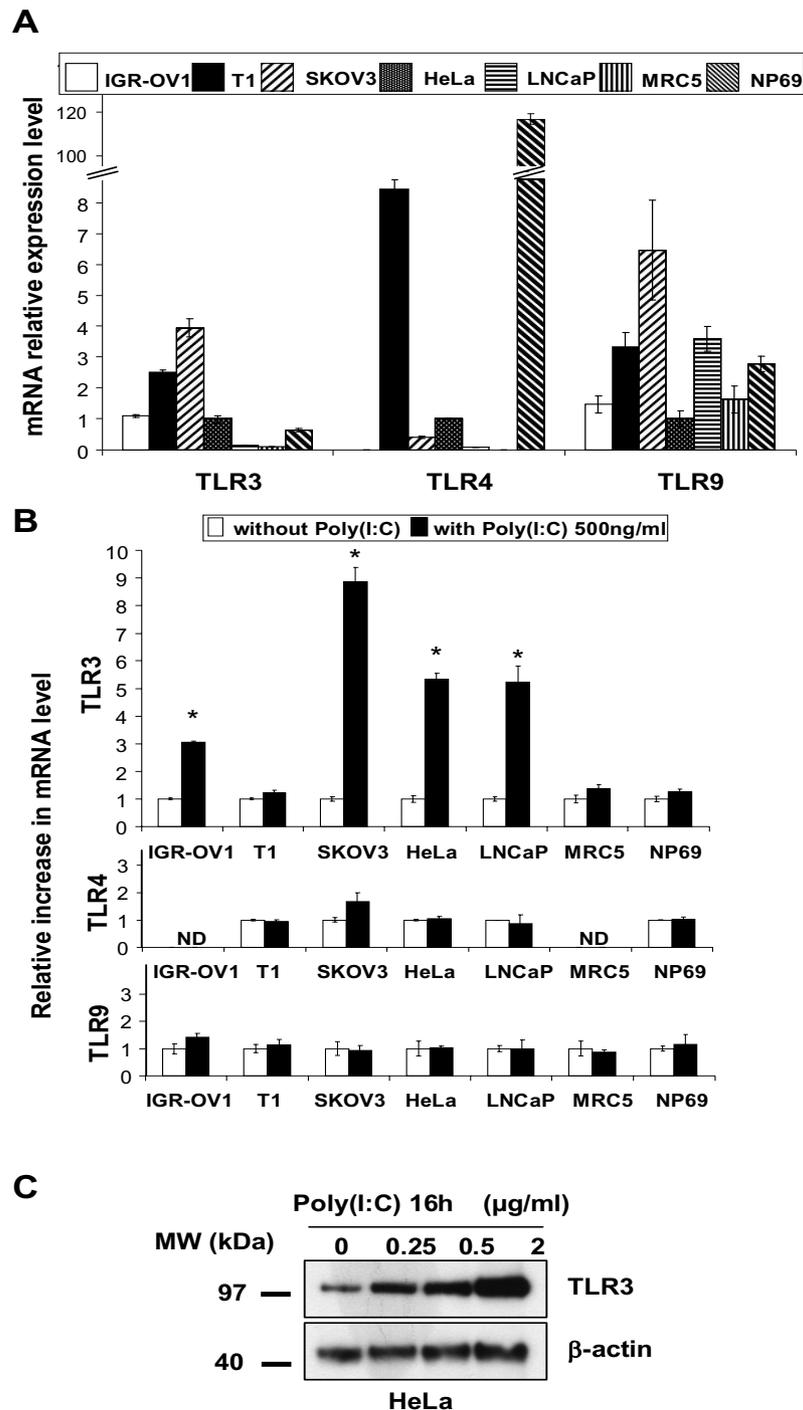
#### **Poly(I:C) treatment increases c-IAP2 protein concentration in various types of human malignant cells**

In our previously published tumor model - nasopharyngeal carcinoma (NPC) - c-IAP2 cell concentrations were uniformly very high whereas c-IAP1 was consistently undetectable [10]. In contrast, we knew from preliminary experiments that the basal levels of c-IAP1 and c-IAP2 were highly variable in various types of non-NPC malignant cells. Therefore we decided to assess the status of several IAP proteins - c-IAP1, c-IAP2 and XIAP - in basal conditions and under treatment by poly(I:C). The panel of cell lines described in the previous experiment completed by two additional melanoma cell lines (SK29 and Rosi) was subjected to stimulation by poly(I:C), 500 ng/ml for 16 h. Then the cell concentrations of IAPs were compared by western blotting in the absence or in the presence of poly(I:C). As shown in Figure 2A, in basal conditions, c-IAP2 was at a low level of concentration in most malignant cell types. However, in the presence of poly(I:C), its concentration was substantially increased in all types of malignant cells with amplitudes varying from 2 (SKOV3) to 10 fold (SK29). In contrast c-IAP2 concentrations were not modified in NP69 and MRC5 (in the lat-

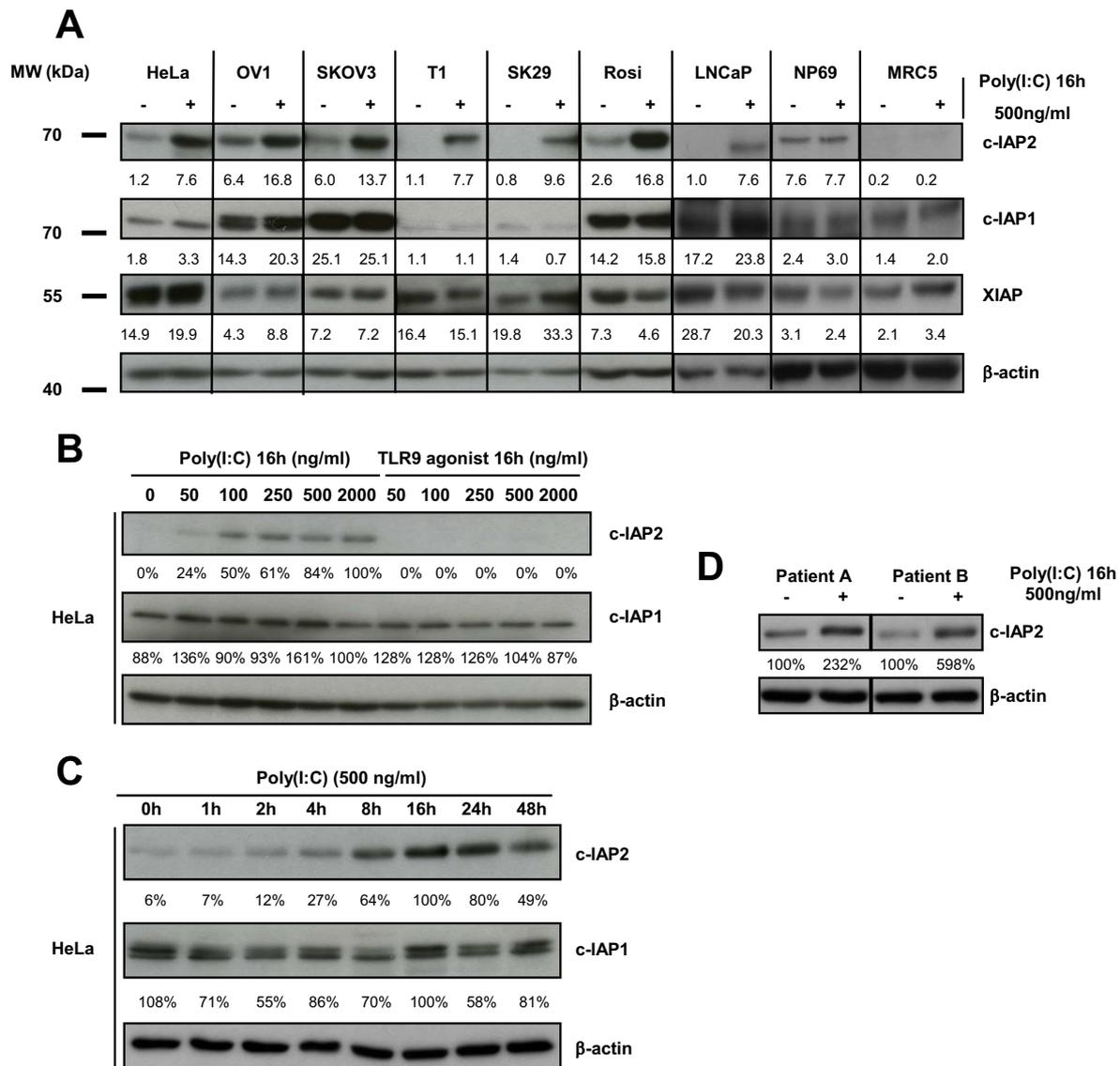
ter, c-IAP2 remained undetectable). Simultaneously, the levels of c-IAP1 and XIAP concentrations were not significantly modified except a 70% increase in XIAP concentration in the SK29 cell line. The dose-effect relationships and kinetics of the increase in c-IAP2 protein expression was investigated in HeLa cells. An increase in c-IAP2 protein concentration was detectable with concentrations of poly(I:C) as low 50 ng/ml; it was dose-dependent from 50 to 250 ng/ml and then reached a plateau (Figure 2B). Stimulation by a TLR9 agonist in the same range of concentrations had absolutely no effect on c-IAP2 concentration. c-IAP1 concentrations were not modified either by poly(I:C) or the TLR9 agonist. In terms of kinetics, the increase in c-IAP2 cell concentration was detectable between 4 and 8 hours with a peak between 16 h and 24 h (Figure 2C). Overall, these data demonstrate a specific increase in c-IAP2 cell concentrations induced by treatment with poly(I:C). This change is restricted to malignant cell types. In HeLa cells it is maximal between 16 h and 24 h and detectable with concentrations of poly(I:C) as low as 50 ng/ml. To provide evidence that the stimulatory effect of poly(I:C) on c-IAP2 expression was not restricted to malignant cell lines permanently propagated *in vitro*, we prepared tumor cells derived from Head and Neck squamous cell carcinomas and used them in short term primary cultures. These cells directly explanted from fresh tumors were treated with poly(I:C) (500 ng/ml) for 16 h. As shown in Figure 2D, we observed the same dramatic increase in c-IAP2 concentration.

#### **Poly(I:C) treatment specifically enhances c-IAP2 expression through TLR3 stimulation**

In order to understand how the cell concentration of c-IAP2 was increased by poly(I:C), we investigated its influence on the transcription of the c-IAP2 gene (*BIRC3*) in 5 malignant and 2 non-malignant cell types by quantitative reverse-PCR. Under stimulation by poly(I:C) 500 ng/ml, a statistically significant increase in cell concentrations of the *BIRC3* transcripts was observed in 4 of 5 malignant cell types contrasting with virtually no increase in the non-malignant cell types (Figure 3A). In terms of kinetics, HeLa cells showed a dramatic increase in the amount of *BIRC3* transcripts detected as early as 2 hours after the onset of the treatment by poly(I:C) with a plateau reached at 16 hours (Figure 3B). There are several known cellular receptors or sensors for double-strand RNA including TLR3 or PKR (protein kinase R) [23]. PKR is selectively inhibited by 2-aminopurine (2-AP) whereas TLR3 is inhibited by bafilomycin A1 (BFA). BFA is an inhibitor of the endosomal acidification pathway which prevents the adequate function of TLR3 within the endosomal compartment [23]. HeLa cells were stimulated by poly(I:C) (500 ng/ml) or TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) which is a



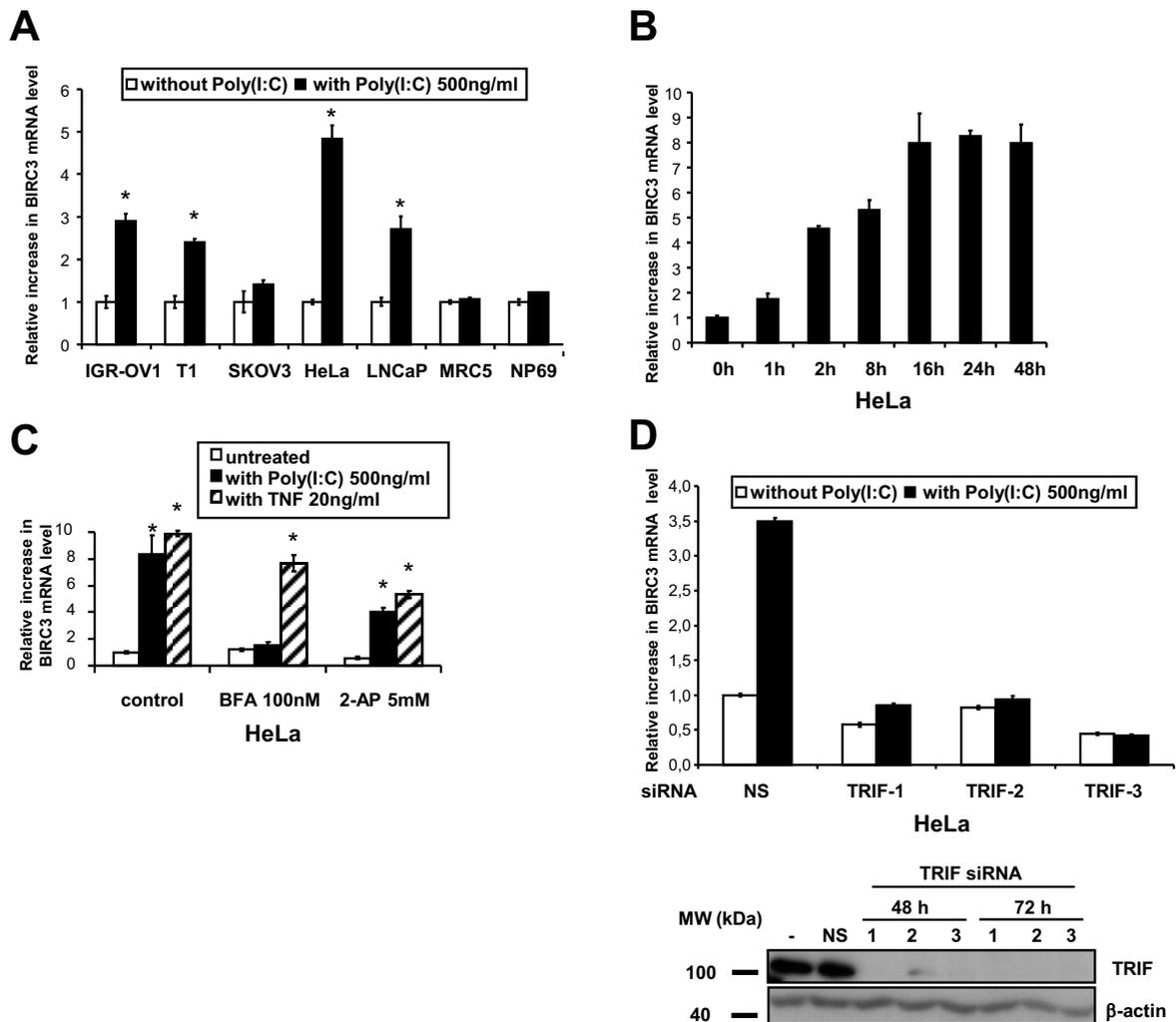
**Figure 1 Assessment of TLR 3, 4 and 9 messenger RNAs and TLR3 protein in a panel of human cell lines in basal conditions and under stimulation by poly(I:C).** A) Relative expression levels of TLR3, 4 and 9 transcripts in basal conditions. Levels of mRNAs in HeLa cells were chosen as a reference and arbitrarily set at 1. B) TLR mRNA relative increase in expression under stimulation by poly(I:C) (500 ng/ml) for 16 h. For each cell type, the basal level of expression was taken as a reference and set at 1. C) Western blot detection of the TLR3 protein in HeLa cells treated for 16 h with increasing concentrations of poly(I:C) (from 250 ng/ml to 2 µg/ml). β-actin staining was used to control protein loading. Data presented in A), B) and C) are representative of at least two similar experiments. The stars indicate a statistical difference from respective controls ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2 Status of the IAP proteins in a panel of malignant and non-malignant cell types in basal conditions and under stimulation by the poly(I:C).** A) Variations in IAP protein concentrations in basal conditions and after 16 h of stimulation by poly(I:C) 500 ng/ml. The c-IAP1, c-IAP2 and XIAP relative concentrations were assessed by iterative staining of blotted membranes.  $\beta$ -actin was used as a loading control for density measurements. B) Exploration of the dose-effects relationships in c-IAP2 induction in HeLa cells treated for 16 h by poly(I:C) (TLR3 agonist) or CpG DNA (TLR9 agonist) at concentrations increasing from 50 to 2000 ng/ml. The same membrane was stained successively with anti-c-IAP2, c-IAP1 and  $\beta$ -actin. C) Western blot analysis of HeLa cells treated with poly(I:C) 500 ng/ml for increasing time intervals from 1 h to 48 h. The same membrane was stained successively with anti-c-IAP2, c-IAP1 and  $\beta$ -actin. D) Increase in c-IAP2 protein expression in malignant cells directly explanted *in vitro* from fresh human tumors. Cells were prepared for short term primary cultures from tumor biopsy fragments obtained from 2 patients designated A and B. These patients were referred for Head and Neck squamous cell carcinomas (see Methods section). Cells were incubated with poly(I:C) immediately after tumor dispersion for 16 h and collected for protein extraction and western blot analysis of c-IAP2 and  $\beta$ -actin expression. Data presented in A), B) and C) are representative of at least two similar experiments.

known inducer of c-IAP2 gene expression, in the absence or in the presence of inhibitors (BFA or 2-AP)(Figure 3C) [24]. BFA combined with poly(I:C) had a dramatic reducing effect on the amount of *BIRC3* transcripts contrasting with almost no effects on *BIRC3* transcription induced by

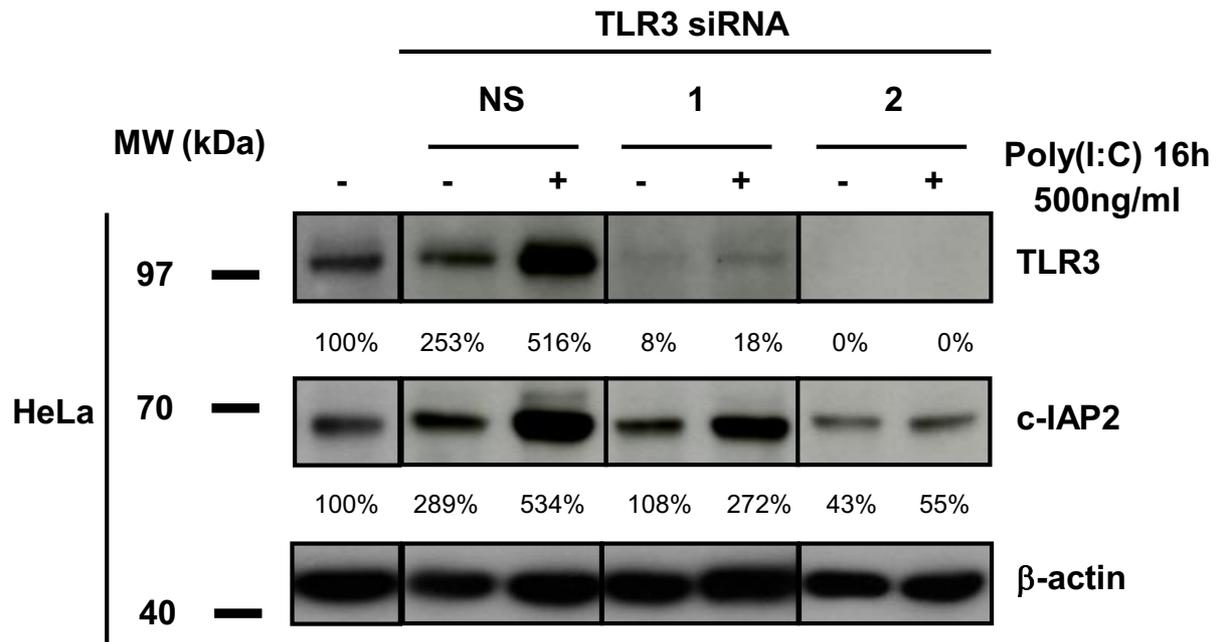
TNF- $\alpha$ . The PKR inhibitor 2-AP had partial decreasing effects on the amount of *BIRC3* transcripts under both poly(I:C) and TNF- $\alpha$  stimulation. The TRIF protein is a key adaptor molecule of TLR3 signal transduction whereas it is not required for signalling by other sensors



**Figure 3 Treatment by poly(I:C) increases c-IAP2 gene (*BIRC3*) transcription in human malignant cells. Inhibition by Bafilomycin A1 and knock-down of TRIF.** A) Cell concentrations of *BIRC3* messenger RNAs are measured by quantitative RT-PCR in several types of malignant cells mock-treated or treated with poly(I:C) for 16 h at 500 ng/ml. Concentration of *BIRC3* transcripts measured in basal conditions were chosen as a reference for each tested cell type and arbitrarily set at 1. B) Kinetics of the increase in the concentration of *BIRC3* messenger RNAs in HeLa cells treated with poly(I:C) 500 ng/ml for increasing time intervals from 1 to 48 h. C) The influence of poly(I:C) on *BIRC3* transcripts is neutralized by Bafilomycin A1, an inhibitor of endosome acidification and TLR3 signalling. Prior to RNA extraction, HeLa cells are incubated for two hours in the presence of poly(I:C) (500 ng/ml) or recombinant TNF  $\alpha$  (20 ng/ml) in combination with Bafilomycin A1 (BFA) 100 nM or 2-aminopurin (2-AP) 5 mM or without additional compound (control condition). D) The induction of c-IAP2 by poly(I:C) in HeLa cells is suppressed when the TRIF adaptor protein is knocked-down using 3 distinct specific siRNA whereas a non-specific (NS) RNA used as a negative control has no inhibitory effect. Upper panel: quantitative PCR assessment of the *BIRC3* transcripts in the absence or in the presence of specific siRNAs. Lower panel: absence of TRIF protein expression detectable by western blot in HeLa cells treated with specific siRNA (1, 2 and 3); in contrast TRIF expression is not altered by a negative control non-specific siRNA (NS). Data are representative of two similar experiments. The stars indicate a statistical difference from respective controls ( $p < 0.05$ ).

of double strand RNAs like PKR [25] and RIG1 [26]. The TRIF protein was knocked out by RNA interference prior to the treatment of HeLa cells with poly(I:C). As shown in Figure 3D, pre-treatment with TRIF-specific siRNAs resulted in a complete abrogation of the increase in *BIRC3* transcription. Finally, to obtain a formal proof of TLR3 involvement, its expression was knocked-down in

HeLa cells, using 2 specific SiRNAs (Figure 4). One of them did not achieve a complete silencing of TLR3: in this context, an increase in c-IAP2 expression was still detected under treatment by poly(I:C). In contrast, when a complete extinction of TLR3 was obtained using a stronger siRNA, there was no detectable increase in c-IAP2 expression.

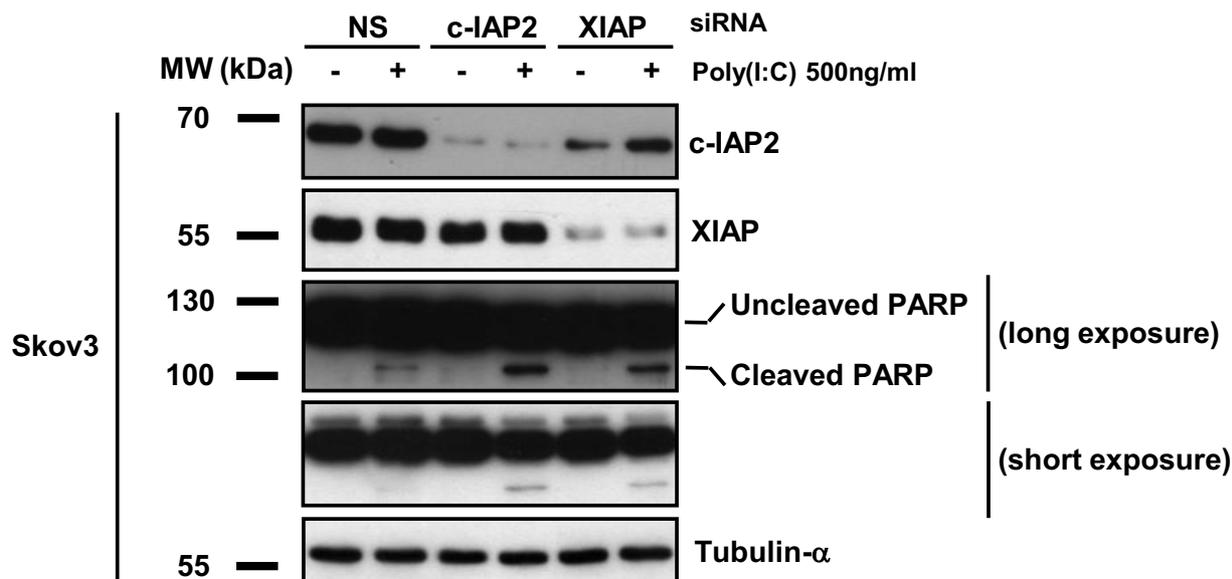


**Figure 4 Knocking-down TLR3 suppresses enhancement of c-IAP2 protein expression by poly(I:C).** Western blot analysis of protein extracts from HeLa cells treated with poly(I:C) (500 ng/ml for 16 h) with or without pre-treatment with TLR3-specific and control (NS) siRNAs. The same membrane was stained successively with anti-c-IAP2, TLR3 and β-actin. Note that the control siRNA by itself enhanced TLR3 and c-IAP2 expression. This is consistent with previous observations and possibly related to the interaction of these small double-strand RNAs with the TLR3 itself regardless of their sequence [36]. In our transfection protocol siRNAs are at 100 nM for the first 4 h and 50 nM for the next 44 h. TLR3 inhibition was not complete with the siRNA n°1 which was apparently weaker than the siRNA n°2. However the siRNA n°1 was strong enough to prevent enhancement of TLR3 and c-IAP2 expression in the absence of poly(I:C). Data are representative of two similar experiments.

#### An IAP inhibitor based on Smac mimicry (RMT 5265) cooperates with poly(I:C) in apoptosis induction

Poly(I:C) has been reported to induce apoptosis in several cell types at high concentrations [5-7]. On the other hand, the rise in c-IAP2 proteins and transcripts observed in our experiments suggested that poly(I:C) was also activating anti-apoptotic pathways, especially pathways involving the IAP family of proteins. We hypothesize that inhibition of c-IAP2 expression could unmask the apoptotic potential of TLR3 stimulation. To address this point Skov3 cells (derived from an ovarian carcinoma) were treated with siRNAs targeting either c-IAP2 or XIAP (Figure 5). An increase in PARP cleavage was observed when cells were treated with poly(I:C) following depletion of either c-IAP2 or XIAP, providing evidence that c-IAP2 as well as XIAP contribute to prevent TLR3-dependent apoptosis. To investigate whether these results could translate in a potential therapeutic strategy, we combined poly(I:C) with a pharmacological inhibitor of the IAP proteins, the Smac mimetic RMT 5265 (Figure 6A). Using the T1 melanoma cell line, we found additive effects of the combined treatment with a large increase in the sub-G1 fraction as shown by flow cytometry (Figure 6B). In

the next experiment, cells from 5 tumor lines were treated with a single agent - either poly(I:C) or RMT 5265 - or by a combination of both agents. Total activities of caspases 3 and 7 were measured by a chemiluminescent assay providing an index of apoptosis. Massive activation of caspase 3/7 was obtained under the combined treatment in 3 out of 5 malignant cell lines (SKOV3, ovarian carcinoma, T1, melanoma and HeLa, Cervix carcinoma)(Figure 7A, middle panel). Caspase 3/7 activation was associated with degradation of the large PARP isoform (Figure 7A, lower panel). The effect of the combined treatment was obviously more than additive for caspase 3/7 activation in HeLa cells. In SKOV3 cells, RMT 5265 by itself was sufficient for caspase 3/7 activation; however, its activity was increased two-fold when the cells were subjected to the combined treatment. A parallel increase in caspase 8 activation was noticed in all three cell types undergoing massive caspase 3/7 activation (Figure 7A, upper panel). The cleavage of caspase 8 was formally demonstrated by western blot analysis in HeLa cells subjected to the combined treatment (Figure 7B). There was also mild apoptosis induction for IGR-OV1 with slight enhancement of caspase 3/7 activity (Figure 7A). LNCaP



**Figure 5 Enhanced apoptosis in Skov3 ovarian carcinoma cells treated with poly(I:C) combined with knocking-down c-IAP2 or XIAP.** Skov3 cells were pre-treated with non-specific (NS), c-IAP2 or XIAP siRNAs with or without subsequent addition of poly(I:C). Cell protein extracts were subjected to western blot and stained successively for c-IAP2, XIAP, PARP and tubulin- $\alpha$ . PARP-cleavage was substantially enhanced by combination of poly(I:C) with c-IAP2 and XIAP siRNAs.

was the only cell line without any evidence of apoptosis induction under the combined treatment. Simultaneously c-IAP2, c-IAP1, XIAP and FLIP-L cell concentrations were assessed in these various experimental conditions by western blotting (Figure 7A, lower panel). Poly(I:C) stimulation induced a strong increase of c-IAP2 concentrations in all cell lines, as shown in previous figures. Treatment with RMT 5265 resulted in a dramatic reduction of c-IAP2 and to a lesser extent c-IAP1 when used alone as well as in combination with poly(I:C). This was observed in all cell lines except IGR-OV1. A reduction of FLIP-L was recorded in several experimental conditions, especially under the combined treatment. XIAP concentration was reduced in cells undergoing massive apoptosis under the combined treatment.

#### Cooperation of poly(I:C) and RMT 5265 in the inhibition of clonogenic growth for various types of human malignant cells

To further explore the anti-tumor potential of the combination of poly(I:C) with RMT 5265, several cell types - IGR-OV1, T1, HeLa, LNCaP and NP69 - were seeded at low density and grown in the presence of single agents or the combination of both (Figure 8). Poly(I:C) and RMT 5265 had virtually no effects on the non-tumorigenic NP69 cells. In contrast a highly significant reduction of clone numbers were obtained for cells undergoing massive apoptosis under the combined treatment, HeLa and T1. A similar reduction of clonogenic growth was

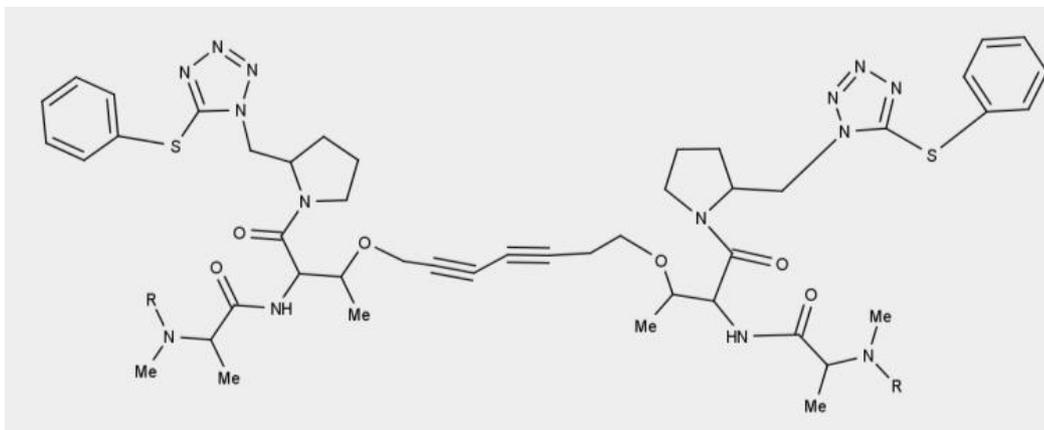
observed for IGR-OV1 cells. Although there was no evidence of apoptosis induction in LNCaP, there was a mild but statistically significant reduction of its clonogenic growth under the combined treatment.

#### Discussion and Conclusions

The aim of this study was to explore the contribution of the IAP family of proteins to the response of cells challenged by the synthetic TLR3 agonist poly(I:C). Our two main findings are a rapid and often dramatic increase in c-IAP2 protein concentration following poly(I:C) stimulation and a cooperative effect of poly(I:C) with the IAP inhibitor RMT 5265 in the induction of apoptosis and/or inhibition of clonogenic growth

The increase in c-IAP2 protein concentration triggered by poly(I:C) has several interesting characteristics. It is constant through all types of human malignant cells tested, including cells directly explanted from fresh tumors. So far we have found no exception to this type of response. Even in NPC cells which have very high constitutive levels of c-IAP2, we found that stimulation by poly(I:C) further increases its expression (Friboulet et al., 2008 and data not shown). However poly(I:C) does not induce any increase in c-IAP2 concentration in two types of non-tumorigenic human cell lines - NP69 and MRC5 - suggesting that this modification is restricted to fully transformed cells. Finally, the increase in c-IAP2 expression has a double specificity. With regard to the TLR fam-

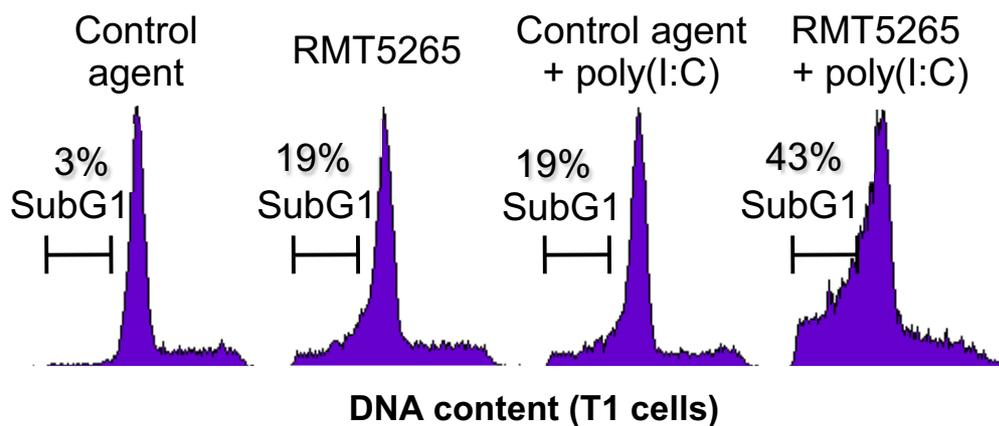
**A**



**RMT 5265 : R = H**

**Control agent : R = CO<sub>2</sub>Bu-t**

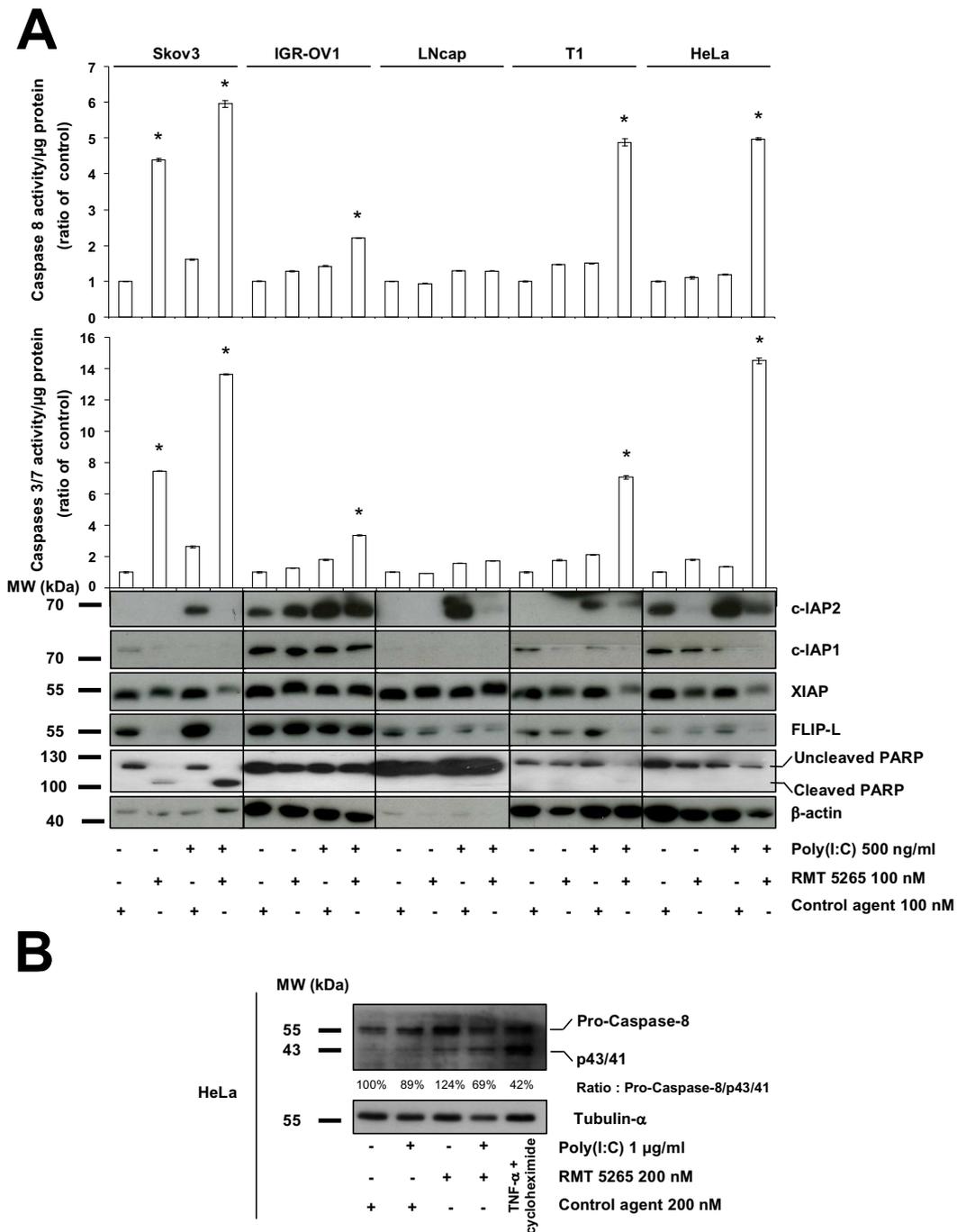
**B**



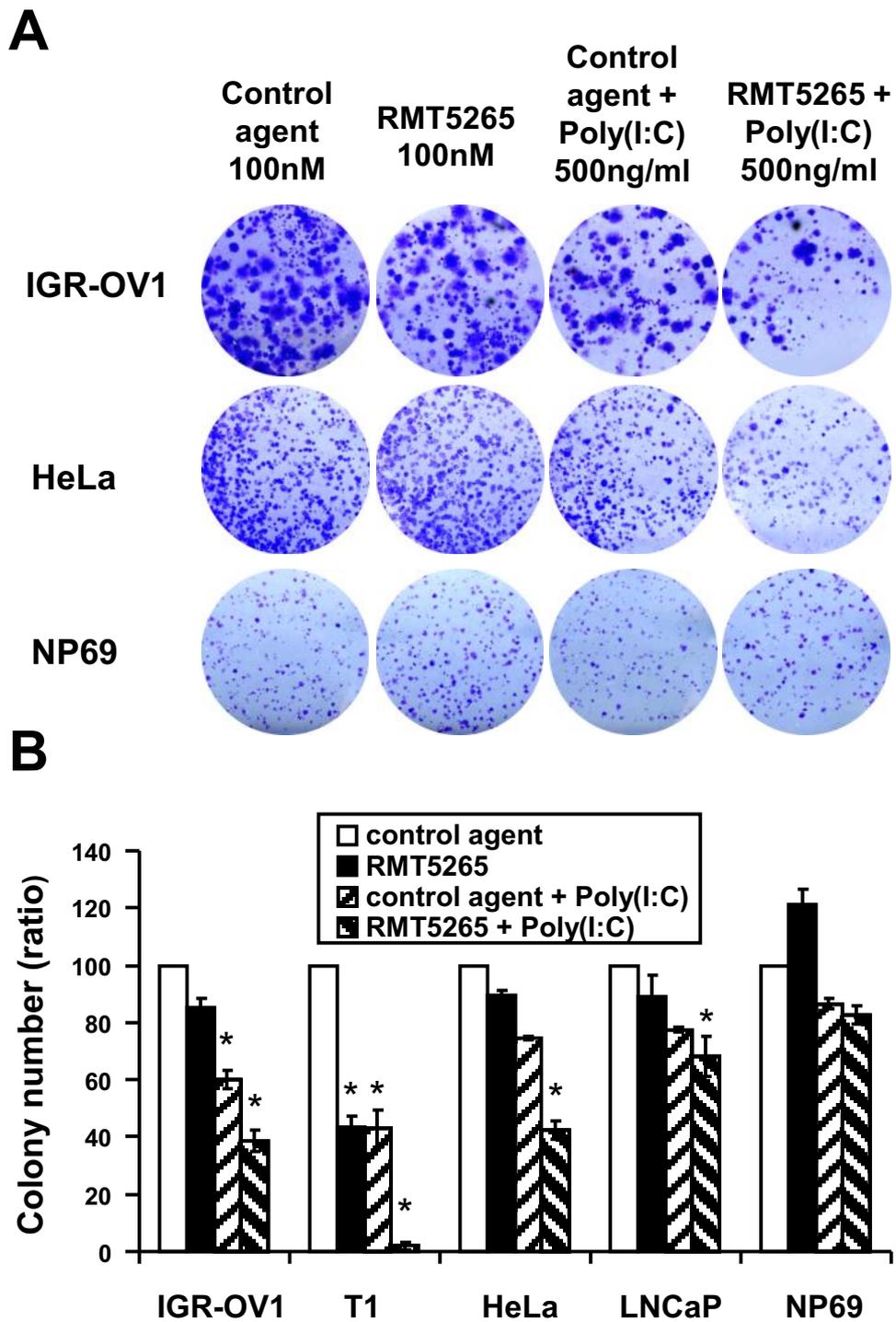
**Figure 6 Induction of apoptosis in T1 cells treated with poly(I:C) combined with a smac-mimetic (RMT 5265).** A) Representation of the RMT 5265 molecule backbone drawn with MARVIN online software: <http://atchimiebiologie.free.fr/marvin/doc/dev/oli.html>. Substitution of one H on both alanines (R = CO<sub>2</sub>Bu-t) results in an inactive compound used as a negative control (HS4044). B) Flow cytometry assessment of the sub-G1 cell fraction in the T1 cell line treated with control compound or RMT 5265 (100 nM; 48 h) with or without poly(I:C)(500 ng/ml; last 16 h).

ily of receptors, it is induced by the TLR3 ligand poly(I:C) but not by ligands of other TLRs for example TLR-9 ligands (Figure 2B). With regard to the IAP family of proteins, although c-IAP1 and c-IAP2 expression are often co-regulated, poly(I:C) has no effect on c-IAP1 expression [27].

In all tumor cell lines but one, the increase in the c-IAP2 protein expression which occurs under treatment by poly(I:C) is, at least to a large extent, related to an increase in the c-IAP2 gene (*BIRC3*) transcription. In this regard, the ovarian carcinoma cell line Skov3 is an exception. It has an increase in the expression of the c-IAP2



**Figure 7 Analysis of biochemical changes in human malignant cell lines treated with poly(I:C) combined to RMT 5265.** A) Cell samples representative of five different cell lines were subjected to the following treatments: control compound or RMT 5265 (100 nM for 48 h) with or without poly(I:C) (500 ng/ml; last 16 h). Caspase 3/7 (middle panel) and caspase 8 (upper panel) activities were measured in cell protein extracts using a chemiluminescent assay. c-IAP2, c-IAP1, FLIP-L and  $\beta$ -actin were detected in additional cellular extracts from the same experimental samples by western blotting using specific antibodies applied successively to the same blotted membrane (lower panel). The stars indicate a statistical difference from respective controls ( $p < 0.05$ ). B) Western blot analysis of caspase-8 cleavage in HeLa cells treated with control compound or RMT 5265 (200 nM for 48 h) with or without poly(I:C) (1  $\mu$ g/ml; last 16 h). In order to provide a positive control for caspase 8 cleavage, HeLa cells were treated with TNF- $\alpha$  (50 ng/ml) plus cycloheximide (2.5  $\mu$ g/ml) for 6 h. The same blotted membrane was stained with anti-tubulin- $\alpha$  for protein loading control.



**Figure 8 Impact of poly (I:C) and RMT 5265 on the clonogenic growth of human cell lines.** Cells from IGR-OV1, T1, HeLa, LNCap and NP69 cell lines were seeded at low densities in 6 well-plates as reported in the Methods section. A) Plates were stained with crystal violet after 2 to 3 weeks of growth. B) Colonies were counted after scanning and digitalization of dried plates (Epson perfection 4990 scanner). For star-marked conditions, the differences in colony numbers with the control condition were statistically significant ( $p < 0.05$ ).

protein without a significant increase in the amount of the corresponding messenger RNA. The change observed at the protein level might result from a mechanism improving translation efficiency - "ribosome shunt" - as previously reported, precisely in a model involving c-IAP2 messenger and protein [28]. This hypothesis would deserve specific future investigations. In any event, we obtained compelling evidence that the changes in c-IAP2 expression observed in HeLa cells treated with poly(I:C) are dependent on the activation of the TLR3/TRIF pathway. Indeed, the increase in *BIRC3* transcription is completely abrogated by Bafilomycin A1 - a chemical agent known to block TLR3 signalling at the endosome level - as well as by knocking-down expression of the TRIF adaptor. Moreover, knocking-down TLR3 itself abrogates the increase in c-IAP2 expression. Currently, we have no idea whether NF- $\kappa$ B or interferon- $\beta$  contribute to enhanced expression of the c-IAP2 gene downstream of TRIF. Nevertheless, in future studies, the increase in c-IAP2 expression is likely to provide a novel and sensitive index of malignant cell response to TLR3 stimulation.

Cell treatment combining RMT 5265 with poly(I:C) induces massive apoptosis in 3 of 5 malignant cell lines, with obvious synergy of the 2 compounds in two cases. Apoptosis induction is associated with decreasing cell concentrations of c-IAP2, c-IAP1, XIAP and FLIP-L. RMT 5265 like other smac mimetics is known to induce degradation of c-IAP2 and to a lesser extent c-IAP1 through ubiquitinylation and proteasome degradation [14,15]. Therefore we suspect that the decrease in c-IAP1 and c-IAP2 is an early drug-induced event with a possible causative role in the induction of apoptosis in T1 and HeLa cells. However, despite a dramatic decrease in c-IAP2 concentration and the absence of c-IAP1 expression in LNCaP cells, massive apoptosis is not induced by the combined treatment suggesting that other signalling events are required. c-IAP2 and c-IAP1 are not degraded in IGR-OV1 cells under treatment by RMT 5265. So far, in our experience, there is no other example of a cell line where c-IAP2 and c-IAP1 are resistant to degradation induced by RMT 5265. Nevertheless, we cannot exclude that they are functionally inactivated by RMT 5265 in IGR-OV1 cells. XIAP is usually not degraded by RMT 5265, therefore its decrease in SKOV3, HeLa and T1 cells is probably a consequence of massive apoptosis resulting from its digestion by executionary caspases [29]. So far we have no explanations for the decrease of Flip-L observed in several cell types under the combined treatment. In each of the 3 cell lines undergoing massive apoptosis, caspase 8 activation is prominent suggesting its critical role in the initiation of the process. Consistently, while this manuscript was in preparation, a recent publi-

cation has reported caspase 8 activation in melanoma cells subjected to a combination of poly(I:C) with a smac mimetic [30]. Involvement of caspase 8 is not surprising since RIP1, a major regulator of caspase 8 is under indirect control of TLR3 and c-IAP2. TLR3 stimulation activates RIP1 in a TRIF-dependent manner [31]. In the presence of c-IAP2, RIP1 is expected to activate the canonical NF- $\kappa$ B pathway whereas in the absence of c-IAP2, it will switch to caspase 8 activation [13,32-34]. Verification of this hypothetical mechanism will require further investigation.

The combination of poly(I:C) and RMT 5265 inhibits clonogenic cell growth in all 3 cell lines for which it induces apoptosis. In addition, clonogenic growth was also inhibited in the ovarian carcinoma cell line IGR-OV1 suggesting that the combined treatment has cytotoxic effects even in the absence of massive apoptosis induction. In contrast, the combined treatment has almost no effects on the non-transformed epithelial cell line NP69. This observation raises hope that synthetic TLR3 ligands combined to IAP inhibitors might have selective effects on malignant cells. One basis for this selectivity might be related to the status of TLR3 in malignant cells. In this regard it is interesting to observe a much greater positive feed-back of poly(I:C) on TLR3 expression in most malignant cells compared to MRC5 and NP69 (Figure 1B). In other words, TLR3 seems to be either more abundantly expressed or more "responsive" in fully transformed cells than in non-tumorigenic cells. A point that will need to be addressed in both biological and clinical studies. Assessing in cancer patients the selectivity and efficiency of TLR3 ligands combined to IAP inhibitors is a reasonable aim since both types of compound are already under phase II or III clinical trials [4,35].

#### Abbreviations

BIRC3: baculoviral IAP repeat-containing 3; c-IAP: cellular Inhibitor of apoptosis protein; NPC: Nasopharyngeal Carcinoma; TLR3: toll-like receptor 3; Smac: Second Mitochondria-derived Activator of Caspases; XIAP: X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein; TRIF: Toll/IL-1 Receptor domain-containing Adaptor-Inducing IFN.

#### Competing interests

YM and CP are employed by Innate Pharma a company developing a TLR3 agonist. All other authors certify that they have no conflict of interest.

#### Authors' contributions

LF and CG have performed most of the experiments and prepared the Figures. SWT has provided the NP69 cell line. YM and CP have shared their expertise regarding detection and silencing of the TLR3 protein. ST and CU have provided clinical samples. PB has designed the study and written most parts of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Acknowledgements

This study was supported by grants from the Ligue Nationale contre le Cancer (comités d'île de France) and the Agence Nationale de la Recherche (EBV-inter). We thank Xiaodong Wang, Lin Li and Patrick Harran for generously providing RMT 5265 and HS 4404.

#### Author Details

<sup>1</sup>Univ Paris-Sud, CNRS-UMR 8126 and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif, France, <sup>2</sup>Department of Anatomy, the University of Hong-Kong, Hong-Kong, <sup>3</sup>Innate Pharma, 117 Avenue de Luminy, F-13276 Marseille, France, <sup>4</sup>Univ Paris-sud and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, cervico-facial surgery unit, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif, France and <sup>5</sup>Univ Paris-sud and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, gynecology unit, 39 rue Camille Desmoulins, F-94805 Villejuif, France

Received: 26 March 2010 Accepted: 24 June 2010

Published: 24 June 2010

#### References

- Matsumoto M, Funami K, Oshiumi H, Seya T: **Toll-like receptor 3: a link between toll-like receptor, interferon and viruses.** *Microbiol Immunol* 2004, **48**:147-154.
- Chen R, Alvero AB, Silasi DA, Steffensen KD, Mor G: **Cancers take their Toll-the function and regulation of Toll-like receptors in cancer cells.** *Oncogene* 2008, **27**:225-233.
- Huang B, Zhao J, Unkeless JC, Feng ZH, Xiong H: **TLR signaling by tumor and immune cells: a double-edged sword.** *Oncogene* 2008, **27**:218-224.
- Laplanche A, Alzieu L, Delozier T, Berlie J, Veyret C, Fargeot P, Luboiniski M, Lacour J: **Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC).** *Breast Cancer Res Treat* 2000, **64**:189-191.
- Salaun B, Coste I, Risoan MC, Lebecque SJ, Renno T: **TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells.** *J Immunol* 2006, **176**:4894-4901.
- Morikawa T, Sugiyama A, Kume H, Ota S, Kashima T, Tomita K, Kitamura T, Kodama T, Fukayama M, Aburatani H: **Identification of Toll-like receptor 3 as a potential therapeutic target in clear cell renal cell carcinoma.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:5703-5709.
- Jiang Q, Wei H, Tian Z: **Poly I: C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway.** *BMC Cancer* 2008, **8**:12.
- Salaun B, Lebecque S, Matikainen S, Rimoldi D, Romero P: **Toll-like receptor 3 expressed by melanoma cells as a target for therapy?** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:4565-4574.
- Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M, Hacker G: **Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells.** *Cell Death Differ* 2010, **17**:942-951.
- Friboulet L, Pioche-Durieu C, Rodriguez S, Valent A, Souquere S, Ripoche H, Khabir A, Tsao SW, Bosq J, Lo KW, Busson P: **Recurrent overexpression of c-IAP2 in EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: critical role in resistance to Toll-like receptor 3-mediated apoptosis.** *Neoplasia* 2008, **10**:1183-1194.
- Hunter AM, LaCasse EC, Korneluk RG: **The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets.** *Apoptosis* 2007, **12**:1543-1568.
- Hu S, Du MQ, Park SM, Alcivar A, Qu L, Gupta S, Tang J, Baens M, Ye H, Lee TH, et al.: **cIAP2 is a ubiquitin protein ligase for BCL10 and is dysregulated in mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas.** *J Clin Invest* 2006, **116**:174-181.
- Bertrand MJ, Milutinovic S, Dickson KM, Ho WC, Boudreault A, Durkin J, Gillard JW, Jaquith JB, Morris SJ, Barker PA: **cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination.** *Mol Cell* 2008, **30**:689-700.
- Varfolomeev E, Blankenship JW, Wayson SM, Fedorova AV, Kayagaki N, Garg P, Zobel K, Dynek JN, Elliott LO, Wallweber HJ, et al.: **IAP Antagonists Induce Autoubiquitination of c-IAPs, NF-kappaB Activation, and TNFalpha-Dependent Apoptosis.** *Cell* 2007, **131**:669-681.
- Vince JE, Wong WW, Khan N, Feltham R, Chau D, Ahmed AU, Benetatos CA, Chunduru SK, Condon SM, McKinlay M, et al.: **IAP Antagonists Target cIAP1 to Induce TNFalpha-Dependent Apoptosis.** *Cell* 2007, **131**:682-693.
- Petersen SL, Wang L, Yalcin-Chin A, Li L, Peyton M, Minna J, Harran P, Wang X: **Autocrine TNFalpha signaling renders human cancer cells susceptible to Smac-mimetic-induced apoptosis.** *Cancer Cell* 2007, **12**:445-456.
- Yang QH, Du C: **Smac/DIABLO selectively reduces the levels of c-IAP1 and c-IAP2 but not that of XIAP and livin in HeLa cells.** *J Biol Chem* 2004, **279**:16963-16970.
- Li L, Thomas RM, Suzuki H, De Brabander JK, Wang X, Harran PG: **A small molecule Smac mimetic potentiates TRAIL- and TNFalpha-mediated cell death.** *Science* 2004, **305**:1471-1474.
- Busson P, Keryer C, Ooka T, Corbex M: **EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies.** *Trends Microbiol* 2004, **12**:356-360.
- Benard J, Da Silva J, De Blois MC, Boyer P, Duvillard P, Chiric E, Riou G: **Characterization of a human ovarian adenocarcinoma line, IGROV1, in tissue culture and in nude mice.** *Cancer Res* 1985, **45**:4970-4979.
- Tsao SW, Wang X, Liu Y, Cheung YC, Feng H, Zheng Z, Wong N, Yuen PW, Lo AK, Wong YC, Huang DP: **Establishment of two immortalized nasopharyngeal epithelial cell lines using SV40 large T and HPV16E6/E7 viral oncogenes.** *Biochim Biophys Acta* 2002, **1590**:150-158.
- Tanabe M, Kurita-Taniguchi M, Takeuchi K, Takeda M, Ayata M, Ogura H, Matsumoto M, Seya T: **Mechanism of up-regulation of human Toll-like receptor 3 secondary to infection of measles virus-attenuated strains.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003, **311**:39-48.
- Kalali BN, Kollisch G, Mages J, Muller T, Bauer S, Wagner H, Ring J, Lang R, Mempel M, Ollert M: **Double-stranded RNA induces an antiviral defense status in epidermal keratinocytes through TLR3-, PKR-, and MDA5/RIG-I-mediated differential signaling.** *J Immunol* 2008, **181**:2694-2704.
- Hong SY, Yoon WH, Park JH, Kang SG, Ahn JH, Lee TH: **Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha-, CD40-, and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene.** *J Biol Chem* 2000, **275**:18022-18028.
- Der SD, Lau AS: **Involvement of the double-stranded-RNA-dependent kinase PKR in interferon expression and interferon-mediated antiviral activity.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1995, **92**:8841-8845.
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsumura T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T: **The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses.** *Nat Immunol* 2004, **5**:730-737.
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr: **NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation.** *Science* 1998, **281**:1680-1683.
- Sherrill KW, Lloyd RE: **Translation of cIAP2 mRNA is mediated exclusively by a stress-modulated ribosome shunt.** *Mol Cell Biol* 2008, **28**:2011-2022.
- Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC: **Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases.** *Embo J* 1999, **18**:5242-5251.
- Weber A, Kirejczyk Z, Besch R, Potthoff S, Leverkus M, Hacker G: **Proapoptotic signalling through Toll-like receptor-3 involves TRIF-dependent activation of caspase-8 and is under the control of inhibitor of apoptosis proteins in melanoma cells.** *Cell Death Differ* 2010, **17**:942-51.
- Meylan E, Burns K, Hofmann K, Blancheteau V, Martinon F, Kelliher M, Tschopp J: **RIP1 is an essential mediator of Toll-like receptor 3-induced NF-kappa B activation.** *Nat Immunol* 2004, **5**:503-507.
- Festjens N, Vanden Berghe T, Cornelis S, Vandenabeele P: **RIP1, a kinase on the crossroads of a cell's decision to live or die.** *Cell Death Differ* 2007, **14**:400-410.
- Mahoney DJ, Cheung HH, Mrad RL, Plenchette S, Simard C, Enwere E, Arora V, Mak TW, Lacasse EC, Waring J, Korneluk RG: **Both cIAP1 and cIAP2 regulate TNFalpha-mediated NF-kappaB activation.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2008, **105**:11778-11783.
- Wang L, Du F, Wang X: **TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways.** *Cell* 2008, **133**:693-703.
- Vucic D, Fairbrother WJ: **The inhibitor of apoptosis proteins as therapeutic targets in cancer.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:5995-6000.
- Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, Albuquerque RJ, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, et al.: **Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3.** *Nature* 2008, **452**:591-597.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:  
<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/327/prepub>

doi: 10.1186/1471-2407-10-327

**Cite this article as:** Friboulet et al., Poly(I:C) induces intense expression of c-IAP2 and cooperates with an IAP inhibitor in induction of apoptosis in cancer cells *BMC Cancer* 2010, **10**:327