

THESE EN COTUTELLE

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges et de l'Université Libanaise

Présentée et soutenue par

Racha BAHRI

Le 21 Décembre 2017

**Université
De Limoges**

École Doctorale
Bio-Santé (ED 524)

Spécialité :
*Immunologie,
Oncologie et
Infectiologie*

UMR CNRS 7276-
CRIBL : Contrôle de
la Réponse Immune
B et
Lymphoproliférations

Séquençage du génome complet du virus d'Epstein-Barr dans des prélèvements issus de lymphomes T angio-immunoblastiques

JURY

Rapporteurs

M. Patrice MORAND, PU-PH, Université de GRENOBLE, France

Mme Mireille KALLASSY, Professeur, Université SAINT-JOSEPH, Liban

Examineurs

M. Bernard MARIAMÉ, CR1, Université de TOULOUSE, France

Mme Mira El CHAAR, MCF, Université de BALAMAND, Liban

Directeurs

Mme Sylvie ROGEZ, PU-PH, Université de LIMOGES, France

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, Université de LIMOGES, France

M. Fouad DABBOUSSI, Professeur, Université LIBANAISE, Liban

M. Mohamad Adnan HALABI, MCF, Université LIBANAISE, Liban

**Université
Libanaise**

École doctorale
Sciences et
Technologies
(EDST)

Spécialité :
*Microbiologie
Médicale et
Alimentaire*

Laboratoire de
Microbiologie, Santé
et Environnement

A mon père

A ma mère

A ma sœur

A mes frères

A mon oncle décédé récemment

A mes amis

A mon amour

A tous ceux dont l'oubli du nom n'est pas celui du cœur

.....

- ❖ *Ce travail est dédié à mon père, décédé trop tôt, qui m'a toujours poussée et motivée dans mes études. J'espère que, du monde qui est sien maintenant, il apprécie cet humble geste comme preuve de reconnaissance de la part d'une fille qui a toujours prié pour le salut de son âme. Puisse Dieu, le tout puissant, l'avoir en sa sainte miséricorde.*
- ❖ *Mon oncle, t'as voulu assister à ma soutenance mais ce n'était pas la volonté du Dieu ! Sois sûr qu'en écrivant ces lignes, j'ai les larmes aux yeux et je me souviens de chacune de tes expressions d'encouragement. Mon oncle, merci d'être toujours un exemple d'un homme qui a réussi, merci de me renforcer toujours. Voilà j'y suis ! Je suis « Docteur Rachà BAHRI ». J'espère que tu sois fier de moi ! Je dédie ce travail à ton âme, toi aussi !*



« Pour obtenir ce que l'on veut de la vie, il faut absolument commencer par le commencement : savoir ce que l'on veut. »

Ben STEIN

REMERCIEMENTS

Par ces quelques lignes, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin au bon déroulement de cette thèse, en espérant n'avoir oublié personne...

Je commencerai par remercier le Pr. Michel COGNE pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Pr. Sylvie ROGEE pour m'avoir encadrée, formée et supportée durant ces trois années. Vous avez été bien plus qu'une encadrante de thèse. Vous m'avez appris à être rigoureuse et méthodique et c'est grâce à vos remarques pertinentes que j'ai pu mener à bien ce travail de thèse. Merci de ne m'avoir jamais laissée tomber malgré les situations difficiles que j'ai vécues. Votre phrase d'encouragement « t'inquiète pas, on va y arriver » va rester dans ma tête durant toute ma vie !

Un énorme merci au Pr. Jean FEUILLARD, pour la confiance qu'il m'a accordée tout au long de cette thèse. Vous m'avez soutenu en me disant toujours « bravo ma grande ». En outre, les expressions d'encouragements « excellente étudiante », « t'es une perle » que vous avez utilisée pour juger mon travail sont vraiment ancrées dans mon esprit !!

Un grand Merci à M. Mohamad KHALIL, directeur du centre AZM, pour m'avoir accueillie et acceptée de faire une thèse en cotutelle avec la France.

J'adresse mes sincères sentiments et mes respects au Pr. Monzer HAMZE, chef du département de Microbiologie au centre AZM, ainsi que Pr. Fouad DABOUSSI et Dr. Mohamad Adnan HALABI, mes encadrants au Liban, pour leur assistance et leur soutien durant ces trois années. Je leur exprime ma profonde estime pour toutes leurs qualités humaines et professionnelles.

Je remercie sincèrement M. Patrice MORAND, M. Bernard MARIAME ainsi que Mme Mireille KALLASSY et Mme Mira EL CHAAR pour avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs et examinateurs. Je leur exprime ma profonde gratitude en espérant que ce manuscrit de thèse retienne leur intérêt et qu'il leur soit agréable à lire.

Durant ces années, j'ai pu travailler dans un cadre particulièrement agréable, grâce à l'ensemble des membres de l'UMR CNRS 7276. Merci de m'ouvrir l'opportunité de bien vivre les moments de recherche au sein de votre unité.

Je tiens à remercier Pr. Arnaud JACCARD pour nous avoir fourni les échantillons sur lesquels on a travaillé.

Je remercie également M. Alain CHENAUVEL, Mme Sandrine ROBERT, et les laborantines du service de Virologie pour leur aide technique.

Un grand MERCI...

- A Chantal, Héloïse, Catherine, Valeria, Christelle, Hazar, Nathalie, Morgane, Pauline, Robin, Oussama et Nicolas. Je vous remercie du fond du cœur pour votre gentillesse ainsi que pour votre aide.

- A Imane, Zeinab, Batoul, Nour, Lina, Israa, Hussein, Omar et Mohamad BAYDOUN, mes collègues qui sont devenus très rapidement mes proches amis, pour les bons moments que nous avons passés ensemble ainsi que pour leur amitié. Je ne vous oublierai jamais.

- A François BOYER, qui m'a été d'une grande assistance pour la réalisation de l'analyse bio-informatique décrite ici et également un grand merci pour sa bonne humeur communicative.
- A David RIZZO, qui m'a appris à faire l'expérience de clonalité des cellules B et T. Sans toi, c'était difficile de les gérer.
- A Nathalie FAUMONT, pour son aide technique avec les souris.
- A Victor, Valentin, Emilie GUERRIN et Rémi MOULINAS qui m'ont aidé à réaliser le séquençage à haut débit au début de ma thèse.
- A Roselyne, pour son amitié et son soutien dans les moments difficiles et même pour la lecture finale de ce manuscrit.
- A Mohammad SALEH, pour son soutien moral dans les moments les plus difficiles et ses qualités humaines. Vraiment, tu es pour moi plus qu'un frère.
- A Rafik, pour sa compagnie à Stokomani et aux matchs CSP (2), pour sa bonne humeur et pour son aide lorsque j'en avais besoin.
- Tahani et Nivine, pour leur accueil à mon arrivée en France. Vous avez vraiment rendu ma vie en France comme si c'était à côté de mes parents.

Egalement MERCI à

- Ma chère collègue Emilie LERECLEUS, pour tous les bons moments qu'on a passés ensemble et pour avoir relu cette thèse dans la dernière phase de cette aventure.
- Bilal, pour son amitié et pour son aide à faire la mise en page du manuscrit.

Enfin, ce travail de thèse ne voudrait rien dire sans aller plus loin et remercier mes parents pour leur dévouement incommensurable, qui m'ont toujours soutenue et poussée à donner le meilleur de moi-même. Merci tout particulièrement à ma mère qui m'a fait comprendre que la vie n'est pas faite que de problèmes que l'on peut résoudre grâce à des formules mathématiques !

Un grand merci à ma sœur Hala pour avoir toujours été à côté de moi, m'avoir soutenue quand j'en avais besoin et m'avoir donné l'amour du monde qui m'a toujours poussé à supporter tout pour arriver à ce que je veux.

A Mes frères Mohamad, Amer, Rabih, Yahya et Samer, à mes belles sœurs Rania, Hanadi, Asyette et Aicha, à mon beau-frère Khaled, un très grand merci !

Mention spéciale à Hicham, l'ami de mon cœur qui m'a supportée et m'a permis de me lever motivée, le cœur léger et l'esprit tranquille depuis le début de ma thèse. Merci pour le grand amour que tu m'as consacré, j'en avais vraiment besoin. Tu as su être là à chaque instant, malgré la distance, pour me soutenir, me conseiller et me donner confiance en moi. Je t'aime beaucoup !

Mes sincères remerciements à tous les Hommes visibles et invisibles qui m'ont aidé à réaliser cette thèse. Il faut avouer là, que la thèse est loin d'être un travail solitaire !

A tous, un grand MERCI !!!

Résumé

RESUME

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus humain qui infecte plus de 90% de la population mondiale. Il est décrit comme associé à plusieurs pathologies cancéreuses humaines comme les carcinomes nasopharyngés et gastriques et divers lymphomes, comme le lymphome de Burkitt, les lymphomes NK/T et certains lymphomes de Hodgkin.

Le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI), un cancer des cellules T folliculaires *helper* T_{FH}, contient souvent des cellules B porteuses de l'EBV. Mais jusqu'à présent le rôle de l'EBV dans la pathogenèse de cette maladie reste inconnu.

Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif de déterminer si l'EBV associé au LTAI présentait une particularité laissant envisager son rôle dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons étudié la séquence complète de l'EBV au sein d'échantillons de LTAI et comparé les résultats à ceux obtenus pour d'autres lymphomes (B, NK/T) ainsi qu'aux séquences publiées.

Le séquençage a tout d'abord été réalisé sur 7 lignées cellulaires positives pour l'EBV, afin de valider la technique, et a ensuite été appliqué aux échantillons d'adénopathies de 40 patients atteints de syndrome lymphoprolifératif, parmi lesquels 20 souffraient de LTAI. L'enrichissement en génome viral a été réalisé par capture à l'aide de sondes spécifiques du génome de l'EBV. Ensuite, les bibliothèques ont été synthétisées et séquencées sur les plateformes *Illumina MiSeq* et *NextSeq*. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé l'assemblage *de novo* des reads et déterminé la séquence complète du virus majoritaire dans chaque échantillon. Les données obtenues ont été analysées bioinformatiquement.

D'une manière intéressante, le virus a été trouvé clonal ou quasi-clonal dans les LTAI alors que les lymphocytes B étaient dans la plupart des cas polyclonaux. En outre, le profil de mutations trouvé présentait des similitudes avec ce qui était trouvé pour les autres lymphomes associés à l'EBV, notamment au niveau des épitopes cibles des cellules de l'immunité suggérant un processus de sélection de la souche virale identique à celui d'une tumeur clonale associée à l'EBV. Ceci pourrait jouer un rôle important dans l'échappement au système immunitaire du virus dans ce contexte multicellulaire complexe. La présence de cellules B polyclonales avec un EBV clonal dans un compartiment T tumoral clonal pourrait relever d'une double sélection tumorale, endogène T et exogène EBV clonal, et pourrait suggérer l'existence de cross-talk entre les cellules B-T.

Mots-clés : virus d'Epstein-Barr, lymphomes, lymphome T angio-immunoblastique, séquençage, mutation, clonal, épitopes, échappement au système immunitaire

Abstract

ABSTRACT

More than 90% of the world's population is infected by Epstein-Barr virus (EBV), a human herpesvirus. EBV is thought to be implicated in the pathogenesis of several human malignancies including epithelial tumors such as nasopharyngeal and gastric carcinomas as well as lymphoproliferative diseases such as Burkitt's lymphoma, NK/T lymphomas and some Hodgkin lymphomas.

In angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), a peripheral neoplasm of follicular helper T (T_{FH}) cells, a recurrent finding is the presence of EBV-positive B lymphocytes at the beginning of the disease. However, whether this EBV infection of B cells plays a role in AITL pathogenesis remains unclear.

In this context, our work aimed to determine if the EBV associated with the AITL presented an oncogenic profile allowing us to consider its role in this pathology. To do this, we sequenced the whole EBV genomes in AITL samples and compared the results to those obtained for other lymphomas (B, NK/T) as well as to previously published sequences.

Sequencing was first performed on 7 EBV-positive cell lines to validate the technique, and then was applied to lymphadenopathy specimens from 40 patients with lymphoproliferative disease, of whom 20 had AITL. Enrichment of the viral genome was performed by capture using specific EBV genome probes. The libraries were synthesized and sequenced on *Illumina MiSeq* and *NextSeq* platforms. In a second step, we performed *de novo* assembly and determined the sequence of the virus in each sample. The data obtained were analyzed bioinformatically.

Interestingly, the virus was found to be clonal or quasi-clonal in AITL, while B cells were in some cases polyclonal. In addition, the mutational pattern was similar to other EBV-associated lymphomas, especially at the level of the target epitopes of immune cells. This could play an important role in the virus escape from the immune system in this context. The presence of polyclonal B cells with clonal EBV in a clonal tumor T cell compartment could be a dual tumor selection; or that is endogenous T and exogenous clonal EBV, and could therefore suggest the existence of a cross-talk between B-T cells.

Keywords: Epstein-Barr virus, lymphomas, angioimmunoblastic T lymphoma, sequencing, mutation, clonal, epitope, immune escape

Abréviations

LISTE DES ABREVIATIONS

A

Aa : Acides aminés
ADN : Acide désoxyribonucléique
AhR : Aryl hydrocarbon receptor
AKT : Sérine/thréonine kinase/ PKB
ARF : Alternative Reading Frame

B

BALF1 : BamHI a Leftward Frame 1
BARF : BamHI A Rightward Frame
BART : Bam HI-A region rightward transcript
BATF : Basic leucine zipper transcription factor, Activating Transcription Factor -like
Bcl2 : B-cell lymphoma 2
BCL2L11 : Bcl-2-like Protein 11
BCL-6 : B cell lymphoma 6
BCR : B cell receptor
BHRF1 : Bam HI fragment H rightward open reading frame I
BL : Burkitt lymphoma
Btk : Tyrosine kinase Bruton

C

CAEBV : Infection EBV active chronique
CBF1 : Centromere Binding Factor 1
CCC : Covalently Closed Circle
CCL : Chemokine Ligand
CD : Cluster of Differentiation
CFD : Cellules folliculaires dendritiques
CG : Centre Germinal
CK2 : Caséine kinase2

c-Maf : Musculoaponeurotic fibrosarcoma
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV : Cytomegalovirus
C-Myc : Cellular myelocytomatosis
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CR : Conserved region
CR2 : Récepteur 2 du complément
CSF-1 : Colony Stimulating Factor 1
CTAR : Carboxy-Terminal Activating Regions
CTLA4 : Cytotoxic T-lymphocyte associated antigen
CXCL-13 : Chemokine C-X-C motif ligand 13
CXCR5 : Chemokine C-X-C motif receptor 5

D

DC : Cellules dendritiques
DIM : Domaine de dimérisation
DLBCL : Lymphome diffus à grandes cellules B
DLBCL-CI : DLBCL associé à une inflammation chronique
DNMT3A : DNA Methyltransferase 3A

E

E: early
EBER : Epstein-Barr encoded small RNA
EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigens
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EBVaGC : Carcinome gastrique associé à l'EBV
ERK : Extracellular signal-regulated Kinase

F

Foxp3 : Forkhead box P3
FT : Facteur de transcription

G

GC : Carcinome gastrique
Gly/Ala : Glycine/Alanine
Gly/Arg : Glycine/Arginine
Gp : Glycoprotéine

H

HEV : High endothelial venules
HHV : Herpèsvirus Humain
HL : lymphomes de Hodgkin
HLA : Human Leukocyte Antigen
HLH : lymphohistiocytose
hémophagocytaire
HRS : Cellules de Hodgkin/ Reed-Sternberg
HSCT : Transplantation des cellules
souches hématopoïétiques
HSV-1 : Herpes Simplex Virus

I

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule
ICOS : Inducible T cell costimulatory
ICOSL : ICOS Ligand
IDH2 : Isocitrate Dehydrogenase 2
IE : Immediate Early
IFN : Interféron
Ig : Immunoglobuline
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
IKK : IκB Kinase
IL : Interleukine
Indels : Insertions ou délétions
IP10 : Interferon-Inducible Protein 10
IR : Internal repeat
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based
Activation Motif

J

JAK3 : Janus Activated Kinase
JNK : c-Jun amino-terminal Kinase

K

KDa : Kilodalton
KSHV : Kaposi's sarcoma-associated
herpesvirus

L

L : Late
LAID : Lymphadénopathie angio-
immunoblastique avec dysprotéinémie
LB : Lymphocyte B
LCL : Lignées cellulaires lymphoblastoïdes
LCV : Lymphocryptovirus
LELC : lympho-épithéliomes gastriques
LFA : Lymphocyte Function Associated
Antigen
LgX : Lymphogranulomatose X
LNH : Lymphome non hodgkinien
LOC : Leucoplasie orale chevelue
LP : Leader Protein
LT : Lymphocyte T
LTreg : LT régulateur
LTAI : Lymphome T angio-immunoblastique
LT-β : Lymphotoxine bêta

M

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
Mcl-1 : Myeloid cell leukemia 1
MDM 2 : Murin Double Minute 2
MEC : Matrice extracellulaire
MMP : Matrix Metallo Proteases
MNI : mononucléose infectieuse

N

NF-κB : Facteur Nucléaire – kb

NK : Natural killer

NLS : Signal de localisation nucléaire

NOS : Non spécifié

NPC : Carcinome du nasopharynx

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

ORF : Open Reading Frame

OriLyt : Origine de réplication lytique

OriP : Origine de réplication latente

P

P38 MAPK: p38 Mitogen Activated Protein Kinase

PAL : Lymphome associé au pyothorax

PBL : Lymphomes plasmablastiques

PCNSL : Primary Central Nervous System Lymphoma

PD1 : Programmed cell Death 1

PD-L1 : Programmed cell Death-Ligand1

PEL : Lymphomes primitifs des séreuses

PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase

PKC : Protéine kinase C

PKR : Double stranded RNA-activated Protein Kinase

pRb : Protein Retinoblastoma

PTCL : Peripheral T-Cell Lymphoma

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PUMA : p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis

PY : Proline/ Tyrosine

R

RACK1 : Receptor for Activated C Kinase

RBP-Jκ : Recombination-Binding Protein Jkappa

REAL : Revised European American Lymphoma classification

RECK1 : RE version inducing Cysteine rich protein with Kazal motifs 1

RG : Arginine-Glycine

RHOA : Ras homolog gene family member A

RIG-I : Gène inductible par l'acide rétinoïque I

RIP : Receptor-Interacting Protein

ROS : Dérivé Réactif de l'Oxygène

S

SAP : SLAM-Associated Protein

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise

SLPT : Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation

SNV : Variation d'un nucléotide

SOT : Transplantation d'organes solides

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

T

TAD : Domaine de transactivation

T-bet : Tbox transcription factor

TCF-3 : T Cell Factor 3

TCR : T-Cell Receptor

TES : Transformation Effector Site

TET2: Ten-Eleven Translocation-2

T_{FH} : follicular helper

TGF-β : Transforming Growth Factor beta

TIA-1 : T-cell intracellular antigen 1

TLR-3 : Toll-like receptor 3

TM : Domaine transmembranaire

TME : Tumor microenvironment

TNF: Tumor necrosis factor

TP1 : Protéine terminale

TPA : 12-O-Tétradécanoyl-Phorbol 13-Acétate

TR : Terminal Repeat

TRADD : TNF Receptor Associated Death
Domain

TRAF : TNF-receptor associated factor

U

U : Région unique

UL : Unique Long

Upa : Urokinase-type Plasminogen
Activator

US : Unique Short

USP7 : Ubiquitin Specific Processing
Protease 7

V

VEGF-A : Vascular endothelial growth
factor

VIH : Virus de l'immunodéficience
humaine

VZV : Virus de la varicelle et du zona

WDR48 : Répétition WD contenant la
protéine 48

ZEBRA : Z Epstein-Barr Replication
Activator

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Observation de l'EBV par microscopie électronique.	31
Figure 2 : Structure du virion de l'EBV.	35
Figure 3 : Organisation du génome de l'EBV sous sa forme linéaire.	36
Figure 4 : Organisation du génome de l'EBV sous sa forme épisomique.....	37
Figure 5 : Carte de restriction obtenue après digestion enzymatique par BamHI.	38
Figure 6 : Schéma représentant le profil de transcription des gènes viraux en fonction des différentes formes de latence.....	48
Figure 7 : Structure de la protéine EBNA-1.	49
Figure 8 : Structure de la protéine EBNA-2.	52
Figure 9 : Schéma de la protéine EBNA-LP.....	54
Figure 10 : Représentation schématisée de la protéine LMP-1.	58
Figure 11 : La signalisation de LMP-1 et du récepteur CD40.	59
Figure 12 : Voies de signalisation activées par les domaines CTAR-1 et CTAR-2.....	60
Figure 13 : Inhibition de la signalisation des cellules B par LMP-2A et maintien de latence.	64
Figure 14 : Structures secondaires des EBER.	66
Figure 15 : La modulation de la signalisation immunitaire innée par les EBER contribue à la pathogenèse médiée par l'EBV.	67
Figure 16 : Les ARN non codants de l'EBV.....	70
Figure 17 : Infection primaire et persistante par l'EBV chez les personnes immunocompétentes.....	72
Figure 18 : Plaques blanchâtres sur la surface dorsale de la langue.....	78
Figure 19 : Schéma représentant la translocation chromosomique du gène <i>c-myc</i> sur le chromosome.80	
Figure 20 : Cellule de Reed-Sternberg indiquée par une flèche.	81
Figure 21 : Les trois signaux pour l'activation des lymphocytes CD4+.	101
Figure 22 : Principaux sous-types de lymphocytes CD4 auxiliaires.....	103
Figure 23 : Dynamique des cellules T _{FH} et B au sein du ganglion lymphatique.	104
Figure 24 : Modèle théorique de la pathogenèse du LAI montrant les interactions entre les cellules néoplasiques et les différents composants cellulaires du microenvironnement.	115
Figure 25 : Modèle théorique de la pathogenèse du LTAI.....	124
Figure 26 : Vue générale de l'amplification générique.	137
Figure 27 : Vérification de la taille des fragments par Agilent Bioanalyzer.	142
Figure 28 : Premières étapes de la synthèse des bibliothèques.	144

Figure 29 : Schéma de l'hybridation avec les sondes spécifiques des génomes d'EBV.	143
Figure 30 : Schéma de l'analyse hétéroduplex et GeneScanning des produits de PCR, obtenus à partir des réarrangements des gènes d'Ig et de TCR.	149
Figure 31 : Les cibles cellulaires de miARN de l'EBV dans les lymphomes B.	201

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Famille des Herpesviridae.	33
Tableau 2 : Cycles lytique et latent de l'EBV.	73
Tableau 3 : Pathologies bénignes causées par l'EBV.	75
Tableau 4 : Pathologies malignes chez les sujets immunocompétents.	89
Tableau 5 : Pathologies malignes chez les sujets immunodéprimés.	93
Tableau 6 : Les marqueurs de cellules T.	99
Tableau 7 : Les marqueurs des cellules T _{FH}	106
Tableau 8 : Manifestations pouvant accompagner le LTAI.	112
Tableau 9 : Diagnostics différentiels du lymphome LTAI, PTCL-NOS et le lymphome anaplasique à grandes cellules.	114
Tableau 10 : Mutations épigénétiques identifiées dans les LTAI.	120
Tableau 11 : Autres anomalies moléculaires observées dans les LTAI.	121
Tableau 12 : Molécules antitumorales utilisées en chimiothérapie.	126
Tableau 13 : Mélange réactionnel et conditions d'amplification pour la PCR.	138
Tableau 14 : Protocole standard de BIOMED-2 pour l'amplification des chaînes du TCR et BCR.	147
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des miARN de l'EBV, leurs cibles et leurs fonctions dans les lymphomes NK et T.	202

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	7
RESUME	11
ABSTRACT	13
LISTE DES ABREVIATIONS	15
LISTE DES FIGURES.....	19
LISTE DES TABLEAUX	21
SOMMAIRE	23
Avant-propos.....	27
Chapitre I : Le virus d'Epstein-Barr	31
I.1. Historique	31
I.2. Taxonomie	32
I.3. Epidémiologie	34
I.4. La particule virale : le virion.....	35
I.4.1. Structure du virion	35
I.4.2. Le génome viral.....	36
I.4.2.1. Description	36
I.4.2.2. La carte de restriction du génome viral	38
I.4.2.3. Polymorphisme génétique de l'EBV	39
I.5. Les cellules cibles de l'EBV.....	40
I.5.1. Cellules cibles conventionnelles	40
I.5.1.1. Les cellules épithéliales	40
I.5.1.2. Les cellules B.....	41
I.5.2. Cellules cibles non conventionnelles	42
I.5.2.1. Autres types cellulaires : cellules T, cellules NK et monocytes.....	42
I.6. Biologie de l'infection par l'EBV.....	44
I.6.1. Le cycle lytique.....	44
I.6.2. La latence virale	46
I.6.2.1. Les différents programmes de latence	47
I.6.2.2. Les protéines de latence	49
I.6.2.2.1. Les protéines nucléaires EBNA	49
A. La protéine EBNA-1.....	49
B. La protéine EBNA-2	51
C. La protéine EBNA-LP	54
D. Les protéines EBNA-3 (EBNA-3A/-3B/-3C).....	55
I.6.2.2.2. Les protéines LMP	57

a. La protéine LMP-1	57
b. Les protéines LMP-2A/2B	62
I.6.2.2.3. Les ARN et microARN viraux	65
i. Les ARN EBER	65
ii. Les ARN BART	68
iii. Les microARN de l'EBV	69
I.6.3. Infection par l'EBV et persistance virale	71
Chapitre II. Pathologies associées à l'EBV	75
II.1. Pathologies bénignes	75
II.1.1. La mononucléose infectieuse (MNI)	76
II.1.2. Leucoplasie orale chevelue (LOC)	78
II.2. Pathologies malignes chez les immunocompétents	78
II.2.1. Le lymphome de Burkitt (BL)	78
II.2.2. Le lymphome de Hodgkin (HL)	81
II.2.3. Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)	83
II.2.3.a. DLBCL/EBV+ des sujets âgés	83
II.2.3.b. DLBCL associé à une inflammation chronique (DLBCL-CI)	84
II.2.4. La granulomatose lymphomatoïde	85
II.2.5. Le lymphome NK/T extraganglionnaire de type nasal (NK/TL)	85
II.2.6. Leucémie agressive à cellules NK (ANKL)	86
II.2.7. Carcinome du nasopharynx (NPC)	87
II.2.8. Carcinome gastrique	88
II.3. Pathologies survenant chez l'immunodéprimé	90
II.3.1. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT)	90
II.3.2. Lymphomes associés à l'EBV chez le malade du SIDA	91
II.3.3. Lymphomes primitifs des séreuses (PEL, Primary Effusion Lymphoma)	91
II.3.4. Lymphomes plasmablastiques (PBL)	92
II.3.5. Léiomyosarcomes liés à l'immunodéficience	92
Chapitre III. Physiologie et différenciation des cellules T : les cellules T _{FH}	96
III.1. Introduction	96
III.2. Le thymus : organogenèse et structure	96
III.3. Le développement lymphocytaire	96
III.4. La différenciation des lymphocytes T auxiliaires (CD4+)	100
III.5. Les cellules T _{FH}	104
III.6. Les marqueurs des cellules T _{FH} et leurs fonctions	105
Chapitre IV. Lymphome T angio-immunoblastique	110
IV.1. Introduction	110
IV.2. Épidémiologie	110
IV.3. Aspects cliniques	111
IV.4. Aspects morphologiques, immunophénotypiques et moléculaires	112

IV.5. Le micro-environnement du LTAI.....	115
IV.6. Pronostic.....	118
IV.7. Pathogenèse des LTAI.....	119
IV.7.1. Facteurs de risque	119
IV.7.2. Aspects moléculaires	119
IV.7.3. La relation entre l'EBV et le lymphome LTAI	122
IV.8. Traitement	125
Chapitre V. Objectifs du travail	130
Chapitre VI. Matériels et Méthodes.....	133
IV.1. Matériels.....	133
VI.1.1. Lignées cellulaires	133
VI.1.2. Biopsies congelées et paraffinées de patients	134
VI.1.3. Echantillons de sérum.....	134
VI.1.4. Contrôle	135
VI.2. Méthodes	135
VI.2.1. Culture cellulaire des lignées	135
VI.2.2. Coupes des biopsies paraffinées ou congelées	135
VI.2.3. Extraction.....	135
VI.2.4. Dosage au Nanodrop	137
VI.2.5. Clonage	137
VI.2.6. PCR quantitative de l'EBV	140
VI.2.7. Design des sondes	140
VI.2.8. Dosage Qubit	141
VI.2.9. Synthèse de bibliothèques pour le séquençage Illumina	141
VI.2.10. Dosage au bioanalyseur.....	141
VI.2.11. Analyses bio-informatiques	144
VI.2.12. Séquençage Sanger.....	145
VI.2.13. Clonalité B et T.....	146
Chapitre VII. Publication.....	151
Chapitre VIII. Discussion générale, perspectives et conclusion	155
Références bibliographiques.....	170
Annexe 1. Tableau de patients.....	212
Annexe 2. Mutations au niveau des protéines de latence.....	214
Annexe 3. Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements de l'Ig	218
Annexe 4. Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements de TCR	220

Avant-Propos

Avant-propos

Le point majeur de notre travail a consisté en la caractérisation du génome complet du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans des biopsies issues de patients atteints de lymphomes T angio-immunoblastique (LTAI) et en la comparaison des séquences obtenues avec celles issues d'autres types de lymphomes (pour lesquels l'EBV a été déjà séquencé et une partie de ses pouvoirs oncogéniques ont été découverts) en vue de déterminer si l'EBV est impliqué dans les LTAI.

Le document comprend 8 chapitres :

Les quatre premiers chapitres forment l'objet d'une introduction bibliographique. Au début, nous exposons brièvement l'histoire de la découverte de l'EBV ainsi que sa taxonomie et son épidémiologie. Les structures du virion et du génome de l'EBV sont succinctement présentées par la suite, de même que les cellules-cibles conventionnelles et non conventionnelles du virus. Dans la sous-partie suivante, le cycle biologique de l'EBV est détaillé. Il comprend le cycle lytique et la latence virale ainsi que l'infection par l'EBV *in vivo* durant l'infection primaire et la persistance virale. Les différents types de latence virale et les protéines et ARN viraux essentiels pour la phase de latence ont été présentés dans la sous-partie précédente.

Le second chapitre est consacré aux pathologies liées à l'EBV que nous décrivons de manière détaillée. Ces pathologies y sont abordées d'une part chez les hôtes immunocompétents et d'autre part chez ceux présentant des déficits immunitaires primaires (d'origine génétique) ou secondaires (acquis).

La différenciation des cellules T et notamment des cellules T folliculaires helper (T_{FH}) est exposée d'une façon résumée dans le chapitre trois. Ce dernier comprend une petite introduction sur les cellules T suivie d'un paragraphe sur l'organogenèse et la structure du thymus. Le développement lymphocytaire en général, la différenciation des cellules CD4+ en particulier, et des cellules T_{FH} sont abordés dans les parties suivantes. Ce chapitre vise à introduire le chapitre quatre qui décrit le lymphome T angio-immunoblastique. Etant donné que ce dernier a pour origine les cellules T_{FH} , il était donc essentiel de préciser l'origine de ces cellules, leur classification et leurs fonctions biologiques. Les principaux marqueurs des cellules T_{FH} sont également détaillés.

Le quatrième chapitre comporte plusieurs sous-parties qui consistent à décrire le LTAI : historique de découverte, épidémiologie, aspects cliniques, aspects morphologiques, immunophénotypiques et moléculaires. Dans la sous-partie subséquente, nous expliquons en détail les interactions entre les cellules du micro-environnement des LTAI et les cellules T_{FH} tumorales, en précisant à chaque fois leur rôle dans la lymphomagenèse s'il est découvert. Ensuite le pronostic, les facteurs de risque, les aspects moléculaires comprenant la clonalité des récepteurs des cellules T et B (TCR et BCR) ainsi que les anomalies cytogénétiques sont abordés. La partie bibliographique est clôturée par l'étude de la relation entre l'EBV et les LTAI qui reste inconnue jusqu'à ce jour. Ce qui était la base de notre projet qui consiste à essayer de comprendre si l'EBV peut être impliqué directement *via* son génome dans la lymphomagenèse.

La seconde partie comprend également quatre chapitres. Le premier précise les objectifs de la thèse. Il restitue la problématique de l'étude en fonction des travaux antérieurs du laboratoire et des données bibliographiques qui ont conduit à notre hypothèse de travail.

L'ensemble des matériels et des méthodes est récapitulé dans le chapitre suivant.

Les résultats obtenus sont présentés dans un troisième chapitre et font l'objet d'un article scientifique soumis au Journal of Clinical Investigation. Ils comprennent les résultats sur la validation de la technique de séquençage, le profil de mutations dans les LTAI par comparaison aux autres types de lymphomes B, NK et T, la répartition des mutations sur les différentes régions du génome, notamment au niveau des gènes de latence ainsi que leurs rôles qui sont essentiellement marqués dans l'échappement au système immunitaire. En outre, ce chapitre contient les arbres phylogéniques construits en se basant sur les séquences complètes obtenues des génomes, ainsi que sur les séquences des gènes de latence. Les clonalité EBV, B et T sont également présentées. Les questionnements majeurs découlant de la discussion et les perspectives de cette étude sont abordés à la suite de l'article.

Dans le quatrième et dernier chapitre, une discussion générale complémentaire de celle déjà réalisée dans la partie « résultats » est effectuée. Elle permet d'appréhender le sujet d'une manière plus globale et d'apporter des éléments de discussion complémentaires. Elle permet de plus d'aborder les perspectives du travail.

Introduction Bibliographique

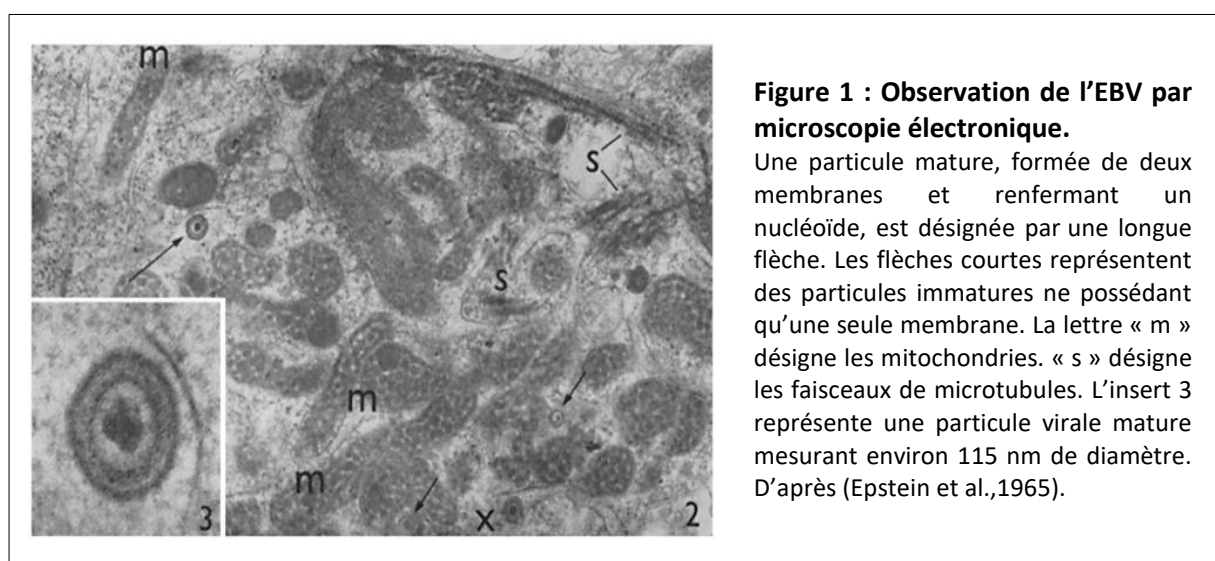
Chapitre I : Le virus d'Epstein-Barr

I.1. Historique

En 1958, Denis Burkitt, un chirurgien britannique, a décrit cliniquement une tumeur du maxillaire survenant chez des enfants africains (Burkitt, 1958), et cette tumeur a été appelée lymphome de Burkitt (BL, *Burkitt lymphoma*) (Burkitt and O'Connor, 1961; Burkitt, 1962a). La distribution géographique de ce lymphome se confondait avec les zones d'endémie du paludisme dans les régions d'Afrique équatoriale, suggérant l'implication d'un agent infectieux (Burkitt, 1962b ; Burkitt and Wright, 1966).

Suite à la conférence du Docteur Burkitt sur ce sujet à Londres en 1961, il y eut une collaboration avec Anthony Epstein (virologue intéressé par les virus oncogènes) et son étudiante Yvonne Barr pour rechercher la présence éventuelle de particules virales au sein de biopsies issues de tumeurs congelées. Ces derniers auteurs ont réussi à établir les premières lignées cellulaires provenant de ces biopsies après trois ans (Epstein and Barr, 1964). Après plusieurs semaines de culture *in vitro*, et avec l'aide de Bert Achong, ils ont réussi à observer des particules virales par microscopie électronique (**Figure1**).

Ces dernières présentaient l'aspect d'un herpèsvirus inconnu à l'époque, auquel on a donné le nom de virus d'Epstein-Barr (EBV) (Epstein et al., 1965).



Quelques années plus tard, des études séro-épidémiologiques menées par la famille Henle ont montré la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes de l'EBV dans les sérums d'enfants africains atteints de BL, ainsi que dans ceux de sujets adultes sains provenant du monde entier (environ 90 % de la population mondiale sont identifiés comme possédant ces anticorps), ce qui indique que l'infection par l'EBV est ubiquitaire. Des analyses sérologiques ont ensuite identifié l'EBV comme agent étiologique de la mononucléose infectieuse (MNI) (Henle et al., 1968).

A la même époque, la capacité de transformation du lymphocyte B par l'EBV *in vitro* conduisant à l'obtention de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL) a été mise en évidence par plusieurs équipes (Henle et al., 1967; Pope et al., 1968; Gerper et al., 1969 ; Miller, 1974).

Dans les années 1970, deux équipes ont montré indépendamment la présence du génome de l'EBV dans les cellules de BL et de carcinomes du nasopharynx (NPC) (zur Hausen et al., 1970; Gunvén et al., 1970), ce qui constitue un argument supplémentaire d'un lien étiologique entre l'EBV et certains cancers.

Depuis, l'implication de l'EBV a été prouvée dans de nombreuses pathologies malignes :

- d'origine lymphoïde, comme les lymphomes NK (*Natural killer*) /T, quelques lymphomes non hodgkiniens (LNH) B ou T, certains lymphomes de Hodgkin (HL), et certains syndromes lymphoprolifératifs des immunodéprimés...
- ou d'origine épithéliale telles que les carcinomes du nasopharynx et certains carcinomes gastriques (Ko, 2015).

I.2. Taxonomie

L'EBV ou virus herpès humain de type 4 (HHV4) appartient à la famille des Herpesviridae, sous-famille des *γ-herpesvirinae*, genre *Lymphocryptovirus*.

Les Herpesviridae constituent une famille d'une centaine de virus ayant un large spectre d'hôtes tels que les mammifères, les reptiles, les oiseaux, les amphibiens et les poissons, chaque virus étant étroitement adapté à un seul hôte. Généralement bénignes, les infections par les herpesvirus humains (HHV) peuvent causer la mort chez certains groupes de patients

(grossesse, âges extrêmes de la vie, patients immunodéprimés comme les sujets transplantés ou atteints par le syndrome d'immunodéficience acquise, SIDA) (Ko, 2015).

Leur classification est établie en fonction de leurs propriétés biologiques telles que les caractéristiques de croissance et leur vitesse de réplication (culture *in vitro*), leur tropisme cellulaire et leurs sites de latence (*in vivo*), mais aussi de leurs caractéristiques virologiques (taille et organisation du génome, pourcentage de GC).

A ce jour, neuf herpesvirus strictement humains sont connus. Ils sont ubiquitaires et l'infection est fréquemment endémique. Ils sont regroupés en 3 sous-familles : alpha, bêta et gamma (Leroy et al., 2016) (**Tableau 1**).

Tableau 1 : Famille des Herpesviridae.

<i>Alpha-herpesvirinae</i>	Herpes simplex type 1	HHV1
	Herpes simplex type 2	HHV2
	Varicelle-Zona	HHV3
<i>Beta-herpesvirinae</i>	Cytomégalo virus	HHV5
	Herpes virus humain 6A	HHV6A
	Herpes virus humain 6B	HHV6B
	Herpes virus humain 7	HHV7
<i>Gamma-herpesvirinae</i>	Epstein-Barr	HHV4
	Herpes virus humain 8	HHV8

- La sous-famille des *alpha-herpesvirinae* (α) comprend HHV-1 (HSV-1, herpes simplex virus de type 1), HHV2 (HSV-2, herpes simplex virus de type 2) et HHV-3 (VZV, virus de la varicelle et du zona). Ils ont un cycle répliatif rapide (24h à 48h) et productif avec une destruction cellulaire importante. Les sites d'infection latente sont les ganglions neuro-sensitifs.

- La sous-famille des *bêta-herpesvirinae* (β) comprend HHV-5 (CMV, *cytomegalovirus*) et les *roseolovirus* (HHV-6A, HHV-6B et HHV-7). Ils ont un cycle répliatif lent (plusieurs jours), peu cytolitique et une latence dans les leucocytes et les cellules endothéliales. Leurs sites

d'infection sont les cellules nerveuses, les cellules épithéliales de différents tissus dont les glandes sécrétoires et le système lymphoréticulaire.

- Enfin, la sous-famille des *gamma-herpesvirinae* (γ) est divisée en γ -1 et γ -2.

Les virus γ -1 ou *lymphocryptovirus* (LCV), forment un genre récemment évolué pouvant activer indépendamment la transformation des cellules B (Henle et al., 1968). Le HHV4 ou EBV est considéré comme le prototype de ces virus.

L'HHV-8 (KSHV, *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) ou *rhadinovirus* représente le virus γ -2 classique.

Ils ont un cycle réplcatif long, une latence principalement dans les lymphocytes B et un grand pouvoir oncogène.

Les *gamma-herpesvirinae* se répliquent *in vitro* au sein des cellules lymphoblastoïdes. L'EBV infecte principalement les cellules épithéliales ou fibroblastiques. *In vivo*, il infecte aussi les lymphocytes B ou T dans lesquels il induit des infections lytiques ou latentes.

I.3. Epidémiologie

L'EBV est un virus ubiquitaire qui infecte plus de 95% de la population mondiale. Il est détecté dans toutes les régions du monde (Hjalgrim et al., 2007). La transmission de l'EBV se fait généralement par la salive contenant le virus infectieux (jouets et doigts chez les jeunes enfants, baiser intime chez les adolescents et les adultes). Une transmission transplacentaire ou par le lait maternel a été rapportée dans de rares cas (Meyohas et al., 1996). L'EBV peut également être transmis par transfusion sanguine, voie sexuelle ou lors de la transplantation d'organes (Alfieri et al., 1996; Scheenstra et al., 2004; Higgins et al., 2007). Cependant, la transmission par voie sexuelle reste très controversée car le virus est faiblement retrouvé dans les sécrétions génitales (Thomas et al., 2006).

La primo-infection intervient le plus souvent chez l'enfant et est généralement asymptomatique, même si dans certains cas des symptômes cliniques apparaissent avec une lymphoprolifération bénigne (mononucléose infectieuse).

Le virus de l'EBV est détectable durant toute la vie de l'individu dans les lymphocytes B mémoires circulants (1 sur 106), traduisant l'état de latence du virus, et dans la salive représentant la phase lytique (Hochberg et al., 2004).

I.4. La particule virale : le virion

I.4.1. Structure du virion

Le virion de l'EBV présente une structure commune à tous les herpèsvirus. Il est sphérique, mesure entre 120 et 200nm de diamètre et comprend quatre composants majeurs du centre vers la périphérie (**Figure 2**) :

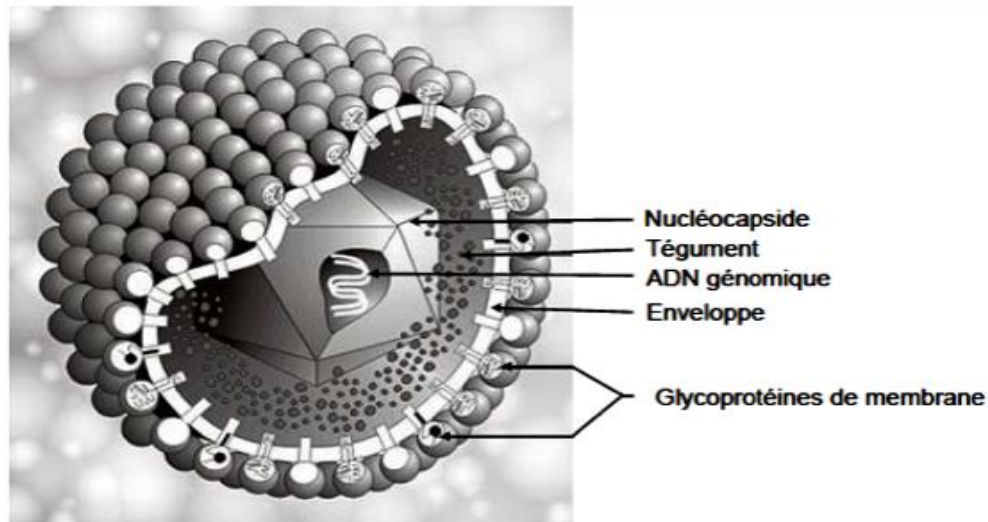


Figure 2 : Structure du virion de l'EBV. Schéma adapté du site web <http://web.njit.edu/~pkb3>.

- Le nucléoïde composé du génome viral sous forme d'ADN linéaire double brin enroulé autour d'une structure protéique basique formant le core (Epstein et al., 1965).
- La capside icosaédrique (20 faces et 12 sommets) qui entoure le génome et protège le core. Elle est formée de 162 sous-unités ou capsomères (150 hexamères et 12 pentamères).
- Le tégument, situé entre la capside et l'enveloppe externe, est composé de protéines virales et cellulaires (dont β -actine, cofiline, tubuline, protéine de choc thermique 90 et protéine de choc thermique 70) impliquées notamment dans les étapes de maturation de la particule virale ou encore lors des étapes précoces de l'infection (Johannsen et al., 2004).
- L'enveloppe lipidique est la structure la plus externe du virus. Elle dérive des membranes cellulaires de la cellule hôte (nucléaire et cytoplasmique) et est constituée d'un double feuillet lipidique. Comme chez les autres herpèsvirus, elle comprend des glycoprotéines virales qui conditionnent l'infectiosité des HHV dans les premières étapes de l'infection

(adsorption/ fusion/ pénétration). Une fois cette enveloppe endommagée, l'EBV perd son pouvoir infectieux. Cette enveloppe étant lipidique, elle peut être fragilisée par des détergents, des acides et d'autres solvants (Young and Rickinson, 2004).

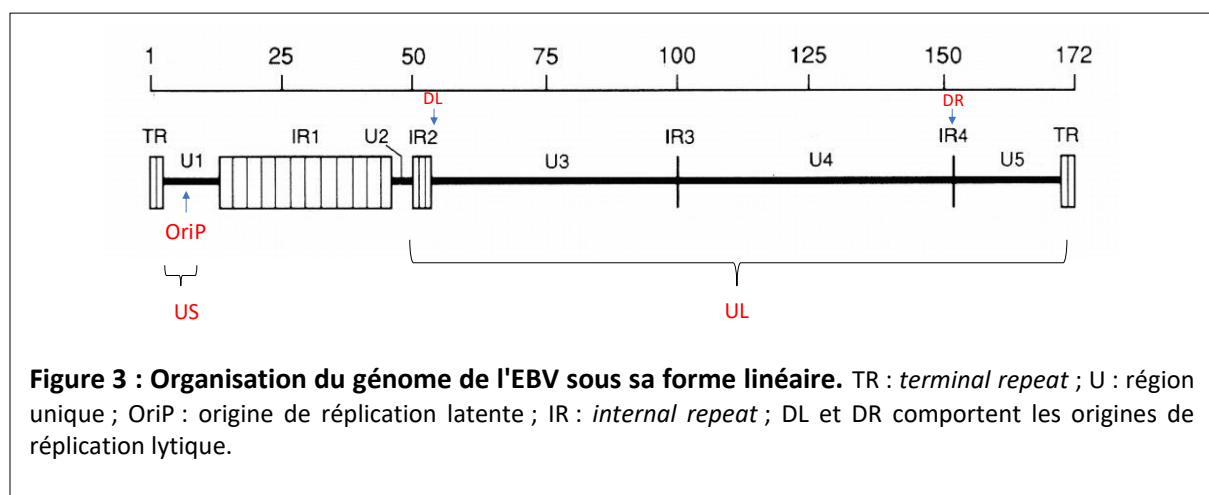
I.4.2. Le génome viral

I.4.2.1. Description

Le génome de l'EBV a été cloné dans *Escherichia coli* en 1980 (Dambaugh et al., 1980) et a été séquencé en totalité pour la première fois à partir de la souche B95.8 en 1984 (Baer et al., 1984). Il s'agit d'une souche virale de référence provenant de lymphocytes B de marmouset infectés par une souche d'EBV isolée chez l'homme au cours d'une primo-infection (Miller et al., 1972).

Le génome de B95.8 présente une large délétion de 11.8 kilobases (comportant 3 cadres de lecture ouverts) par rapport aux autres génomes viraux connus (notamment celui issu de la lignée de lymphome de Burkitt « Raji »).

Dans la particule virale, le génome est un ADN linéaire double brin d'environ 172kb, flanqué à ses deux extrémités de deux séquences répétitives (TR, *Terminal Repeat*) et composé de 60% de guanine et de cytosine (Dambaugh et al., 1980) (**Figure 3**).



Il est divisé en plusieurs parties uniques (U1 à U5) grâce à des répétitions internes de séquences nucléotidiques (IR1, IR2, IR3 et IR4).

IR1 (*Internal Repeat 1*) est la zone répétée la plus importante, elle est constituée en tandems de 7 à 12 séquences identiques mesurant chacune 3,072 pb et sépare le génome en deux parties : une région codante courte de 12 kpb appelée US (*Unique Short*) et une longue de 150 kpb dénommée UL (*Unique Long*).

D'autres séquences répétées courtes (IR2, 3 et 4) sont présentes dans la séquence unique UL et la divisent en sous-domaines (U2 à U5) (Adams and Lindahl, 1975).

A proximité des régions IR2 et IR4, existent deux régions identiques de 1 kpb nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences contiennent toutes les deux les origines de réplication lytique du virus (OriLyt) fonctionnelles durant la phase productive (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

L'ADN viral peut se répliquer aussi à partir d'une autre origine de réplication : l'OriP qui est latente et permet le maintien du virus sous la forme épisomale.

Quatre promoteurs de latence (Cp, Wp, Qp et Fp) ont été décrits. Ils régissent l'expression des protéines EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigens*) au niveau du génome de l'EBV.

Durant l'infection cellulaire, le génome de l'EBV se circularise en utilisant ses séquences terminales répétées formant ainsi un épisode (CCC, *Covalently Closed Circle*) (Adams and Lindahl, 1975) qui peut se lier fortement à la chromatine de la cellule hôte, sans s'intégrer au génome cellulaire (**Figure 4**).

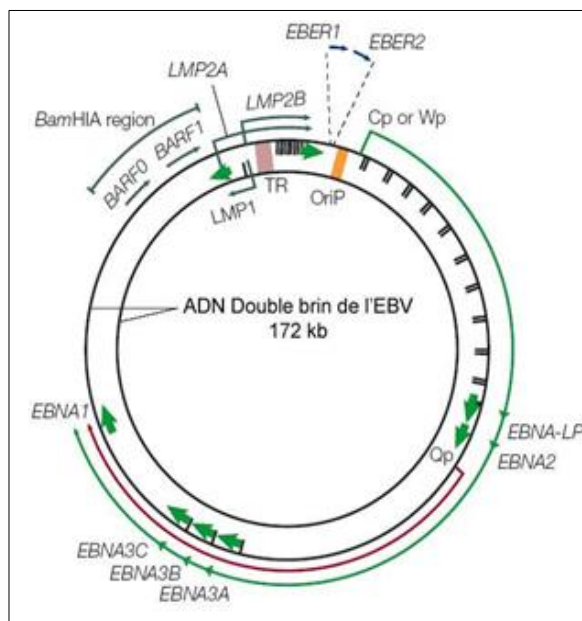


Figure 4 : Organisation du génome de l'EBV sous sa forme épisomale.

OriP : Origine de réplication latente.

Cp, Wp et Qp sont les promoteurs de latence. TR : *terminal repeat*. Les régions codantes des protéines de latence sont représentées par les flèches en vert. Ces protéines de latence sont composées des 6 antigènes nucléaires (EBNA-LP, 1, 2, 3A, 3B et 3C) et des 3 protéines membranaires de latence (LMP-1, LMP-2A et 2B).

Les petites flèches en bleu représentent les ARN transcrits non-traduits EBER (*Epstein-Barr encoded small RNA*).

BARF0 et BARF1 (*BamHI A Rightward Frame 0/1*) appartenant à la région BamHI-A. Modifié d'après (Young and Rickinson, 2004).

I.4.2.3. Polymorphisme génétique de l'EBV

On distingue deux types d'EBV, désignés EBV-1 et EBV-2 (ou EBV de type A et EBV de type B) dont les prototypes sont respectivement la souche B95.8 (Miller et al., 1972) et la souche AG876 (Pizzo et al., 1978).

Ces deux souches ont une répartition géographique différente. L'EBV-1 est prévalent dans le monde entier avec une prédominance dans les pays occidentaux alors que l'EBV-2 est présent en Afrique, plus particulièrement en Afrique Centrale et en Nouvelle-Guinée (Zimber et al., 1986).

Des études *in vitro* ont montré que l'EBV-1 est plus efficace dans la transformation de lymphocytes B primaires en LCL que le type 2 (Rickinson et al., 1987), mais aucune corrélation précise n'a pu être mise en évidence entre les variations génétiques de ces deux types et la fréquence de certaines maladies associées à l'EBV (Palser et al., 2015).

Ces deux types diffèrent par la séquence des gènes codant les protéines de latence EBNA-2, EBNA-3A, -3B et -3C, permettant ainsi de les distinguer et de les identifier.

Les différences les plus marquées ont été observées pour la protéine EBNA-2 avec 47 % de divergence en acides aminés, suivie par les protéines EBNA-3A, -3B et -3C avec une divergence de respectivement 16%, 20% et 28% (Rowe et al., 1989; Sample et al., 1990).

D'autre part, le génome de l'EBV possède un certain nombre de séquences répétées au niveau des régions IR et TR ; il pourra donc avoir des variations à ces niveaux générant différentes souches d'EBV (Sixbey et al., 1989).

Enfin, d'autres polymorphismes génomiques (substitutions, insertions ou délétions) peuvent exister. Par exemple, des délétions dans le gène *LMP-1* et des mutations non synonymes dans les gènes *EBNA-1* et *LMP-2A* aboutissant au changement des épitopes du CD4+ et CD8+ et donc à l'échappement au système immunitaire.

Certaines grandes délétions sont aussi observées dans les génomes des principales souches virales de laboratoire (P3HR-1, Daudi ou B95-8) avec des effets plus ou moins importants selon les régions impliquées. Par exemple, le prototype B95-8 est affecté d'une délétion de 11,8 kpb sans conséquence notable sur les fonctions virales *in vitro*. Par contre, l'absence de certaines séquences génomiques de la souche P3HR-1 la rend incapable d'immortaliser des lymphocytes B *in vitro*.

I.5. Les cellules cibles de l'EBV

L'EBV est impliqué dans la survenue de diverses pathologies cancéreuses, les lymphomes NK/T, le lymphome de Burkitt, le NPC, certains syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT), certains lymphomes hodgkiniens et beaucoup d'autres. Ceci montre que les cibles du virus sont nombreuses et peuvent être divisées en cibles conventionnelles (majoritairement infectées) et non conventionnelles (plus rarement infectées).

I.5.1. Cellules cibles conventionnelles

I.5.1.1. Les cellules épithéliales

Il a été décrit que l'EBV est associé à plusieurs cancers humains comme les carcinomes nasopharyngés et le carcinome gastrique. Il est trouvé dans presque 100% des cas dans les cellules épithéliales tumorales en latence du premier et dans 10% des cas dans celles du deuxième. Il peut se trouver aussi dans les cellules épithéliales non transformées de l'oropharynx mais ceci est occasionnel (Walling et al., 2001), ce qui montre que l'EBV peut cibler les cellules épithéliales *in vivo*, où il exprime certains gènes viraux lytiques ainsi que des gènes viraux latents (Shannon-Lowe et al., 2006).

In vitro, l'EBV ne peut pas produire de nouveaux virions après l'infection des cellules épithéliales. Il ne se maintient pas sur le long terme dans la culture cellulaire. Cela suggère que les cellules épithéliales infectées sont incapables de synthétiser de nouvelles particules virales (Walling et al., 2001).

Contrairement aux mécanismes d'entrée dans les cellules B, la pénétration de l'EBV dans les cellules épithéliales n'est pas encore tout à fait claire. Il a été montré qu'elle ne nécessite ni l'interaction entre la glycoprotéine gp350/220 et CD21, ni l'endocytose vu que les cellules épithéliales sont dépourvues des molécules CD21 et du CMH-II (Miller and Hutt-Fletcher, 1992).

Plusieurs mécanismes de fixation ont été décrits au cours du temps : le premier implique les molécules d'immunoglobulines A (IgA) dimériques secrétées par les cellules B au niveau de la *lamina propria* située sous l'épithélium et les gp350/220 de l'EBV. Cela

favorise l'infection des cellules épithéliales par un mécanisme d'endocytose du complexe IgA-EBV (Sixbey and Yao, 1992).

Le deuxième mécanisme est décrit par deux équipes ; il concerne les glycoprotéines gp85/gp25 du virus et un récepteur des cellules épithéliales non identifié à l'époque de ce travail (Molesworth et al., 2000). Les auteurs ont pu montrer qu'un virus déficient pour l'expression de la gp85 ne peut pas infecter les cellules épithéliales d'où l'importance de cette glycoprotéine. En outre, Borza et ses collaborateurs ont démontré que la présence d'une forme soluble de gp85/gp25 produite par le baculovirus peut interagir spécifiquement à la surface des cellules épithéliales et non aux cellules B et que cette interaction est réduite par un anticorps monoclonal spécifique au complexe gp85/gp25 (Borza et al., 2004).

Le troisième mécanisme, le plus récent, implique la liaison de la glycoprotéine virale de surface BMRF-2 de l'EBV et une intégrine cellulaire $\beta 1$. L'inhibition de cette liaison n'empêche pas totalement l'infection ce qui suggère l'implication d'autres molécules à l'entrée de l'EBV (Tugizov et al., 2003; Xiao et al., 2008, 2009).

L'équipe de Tugizov a aussi décrit *in vitro* un autre mode d'infection des cellules épithéliales de l'oropharynx et cela aussi bien par leur pôle apical que par leur pôle basolatéral : l'EBV peut se propager d'une cellule épithéliale à une autre voisine par leurs pôles latéraux (Tugizov et al., 2003).

Enfin, la fixation de l'EBV aux cellules B peut aider à la liaison entre les cellules B et les cellules épithéliales, permettant l'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales.

L'infection de ces dernières par les cellules B déjà infectées nécessite les gp85/gp25 (Shannon-Lowe and Rowe, 2011) et ce mécanisme s'appelle le transfert d'infection.

I.5.1.2. Les cellules B

L'EBV peut aussi infecter les cellules B qui sont les principales cibles de l'EBV. L'infection commence par la fixation du virus *via* sa glycoprotéine gp350/220 sur le récepteur cellulaire CD21 ou récepteur 2 du complément (CR2) (Frade et al., 1985; Tanner et al., 1987).

La glycoprotéine gp350/220 est une protéine fortement glycosylée et majoritaire de l'enveloppe virale. Sa double nomenclature provient du fait que son ARN messager est épissé d'une manière différente et donne deux formes : une de 350 kilodalton (kDa) et l'autre de 220 kDa (Hummel et al., 1984).

L'interaction gp350/220-CD21 stimule l'endocytose du virus.

Dans une étude récente, Arredouani et ses collaborateurs ont montré que la liaison EBV/CD21 aboutit à l'altération de voies de signalisation majeures censées favoriser la persistance de l'EBV. En particulier, elle modifie l'expression de transcrits d'histones spécifiques des clusters 1 et 2 de la cellule hôte. Ce qui fournit une barrière qui couvre rapidement l'ADN de virus nu (une heure après la fixation), et serait autrement un *nidus* pour la réplication du virus (Arredouani et al., 2014).

Ensuite, la glycoprotéine gp42 de l'enveloppe virale se lie aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)-II présentes à la surface des lymphocytes B et qui forment le co-récepteur de l'EBV. La fixation des deux autres glycoprotéines virales gp25 et gp85 sur ce dernier complexe (gp42-CMH-II) aide à la fusion de l'enveloppe de l'EBV avec la membrane cellulaire et permet donc l'entrée du virus dans la cellule (Fingerroth et al., 1984; Mullen et al., 2002; Johannsen et al., 2004; Szakonyi et al., 2006).

Le génome linéaire du virus se circularise dans les cellules B infectées et reste latent dans le noyau et seulement un faible pourcentage de ces cellules suit une réplication virale spontanée.

Il a été démontré que l'inhibition de l'endocytose induite par le traitement des lymphocytes B avec la chlorpromazine empêche l'entrée de l'EBV dans la cellule d'où l'importance de ce phénomène (Miller and Hutt-Fletcher, 1992; Molesworth et al., 2000).

D'autre part, Holmgren et al. ont décrit un autre mécanisme d'infection de type indirect qui se résume par la pénétration du génome viral dans des cellules, par phagocytose de corps apoptotiques dérivés de cellules B infectées par l'EBV (Holmgren et al., 1999).

I.5.2. Cellules cibles non conventionnelles

I.5.2.1. Autres types cellulaires : cellules T, cellules NK et monocytes

L'EBV est aussi capable d'infecter *in vivo* d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T (Kikuta et al., 1988; Watry et al., 1991; Groux et al., 1997), les cellules NK (Hart et al., 1992; Kaneko et al., 1995) et les monocytes (Revoltella et al., 1989; Savard et al., 2000). Mais cette infection, qu'il s'agisse de primo-infection ou de persistance, paraît être un fait relativement rare. L'EBV y exprime généralement la latence II (Groux et al., 1997).

- Pour les cellules T, l'entrée du virus se fait suite à sa liaison sur le récepteur cellulaire CD21. Ce dernier s'exprime d'une manière très variable selon la maturité des cellules T mais une expression transitoire reste suffisante pour la liaison.

Cependant, un autre mécanisme utilisant une molécule homologue du CD21 a été suggéré pour l'entrée du virus en 1988. Il se base sur l'idée que l'EBV pourrait infecter de nombreuses cellules T de type leucémiques lymphoblastiques CD21 négatif (Tsoukas and Lambris, 1988).

Par ailleurs, Montpellier et ses collaborateurs sont parvenus à obtenir des lignées cellulaires de lymphocytes T immortalisés par l'EBV *in vitro*. Le virus y exprime les protéines EBNA-1 et LMP-1 (*Latent Membran Protein*) (Montpellier et al., 1997).

- Pour les cellules NK, le mécanisme d'infection est mal connu. Elles n'ont pas à leur surface le CD21 mais possèdent le CMH-II (Kasahara and Yachie, 2002). L'équipe de Tabiasco a démontré la capacité des cellules NK à faire des synapses immunologiques avec les cellules B infectées par l'EBV *in vivo* et *via* cette synapse ; elles pourraient acquérir d'une façon transitoire le récepteur CD21 par transfert synaptique et ainsi permettre l'entrée et l'infection par l'EBV (Tabiasco et al., 2003).

In vitro, Isobe et ses collaborateurs, ont réussi à infecter des lignées cellulaires NK leucémiques par l'EBV en 2004. Les stades précoces de l'infection présentent la coexistence d'une infection latente et lytique. La majorité des cellules infectées entrent en apoptose après 72h. Deux clones ont été isolés, ils ont montré l'existence de latence de types I et II. Une étude ultérieure faite par la même équipe a permis d'engendrer des sous-clones de latence II (Isobe et al., 2004, 2008).

- Pour les monocytes, il a été démontré que 20% de ces cellules présentent à leur surface le récepteur CD21, d'où la possibilité d'être infectés par l'EBV (Gosselin et al., 1991). Une fois infectés, les monocytes perdent leur capacité à tuer les cellules par phagocytose. Ces données d'infection et d'altération des fonctions biologiques des monocytes, renforcent l'idée de propagation virale durant les premiers stades de l'infection (Savard et al., 2000).

En outre, il a pu être démontré que l'EBV pourrait infecter d'autres types cellulaires comme les cellules folliculaires dendritiques (Lindhout et al., 1994) et les neutrophiles (Larochelle et al., 1998).

I.6. Biologie de l'infection par l'EBV

Vue d'ensemble :

Plus de 95% de la population mondiale est infectée par l'EBV. La primo-infection est souvent asymptomatique mais peut entraîner chez l'adolescent ou l'adulte jeune une mononucléose infectieuse. Elle se fait au niveau de l'oropharynx. Le virus traverse la barrière oropharyngée constituée de cellules épithéliales, pour infecter les lymphocytes B naïfs sous-jacents. L'EBV peut donc se trouver dans deux états suite à l'infection des cellules hôtes : en état lytique pendant lequel le virus se réplique et un grand nombre de gènes sont exprimés ou en état de latence. Durant cette dernière phase, le génome de l'EBV se circularise sous forme d'épisome et le nombre des gènes exprimés est restreint. Le virus établit ainsi une phase latente dans les lymphocytes B mémoires ce qui permet la persistance du virus tout au long de la vie de son hôte. Cependant, l'EBV peut se réactiver de manière intermittente et initier un cycle lytique suite à des stimuli extérieurs (TGF-bêta, hypoxie, stress...). Ce qui aboutit à la production de nouvelles particules virales capables d'infecter d'autres cellules cibles. La multiplication de l'EBV au niveau de la sphère oropharyngée entraîne le relargage de virions dans la salive permettant ainsi la transmission interhumaine du virus. Pendant toutes les phases du cycle biologique de l'EBV, la pression immunitaire de l'hôte assure le contrôle de l'infection (Rickinson and Kieff, 2007).

Un tableau récapitulant les cycles du virus, les protéines exprimées et les pathologies associées est représenté à la fin de ce chapitre (**tableau 2**).

I.6.1. Le cycle lytique

a) Lors de la primo-infection

Le cycle lytique consiste en une réplication de l'ADN viral, l'expression des protéines de la phase lytique et ainsi la production de nouvelles particules virales en utilisant les machineries enzymatiques cellulaire et virale. Ce qui entraîne la mort des cellules hôtes d'où la désignation de cycle lytique. Ce type d'infection permet au virus de renouveler son pool de cellules infectées et la transmission de l'EBV entre les individus (Young et al., 1991).

Durant cette phase, les deux gènes viraux très précoces ou *Immediate Early* (IE), *BZLF1* et *BRLF1* qui codent respectivement pour les facteurs de transcription Zta (ou ZEBRA : Z

Epstein-Barr Replication Activator) et Rta (également appelée protéine R) sont tout d'abord exprimés.

Zta et Rta sont des activateurs de l'expression des gènes viraux précoces ou *early* (E) tels que *BALF5* (codant pour la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase) et *BMRF1* ainsi que de l'expression d'autres protéines virales impliquées dans la réplication de l'ADN viral. Cette dernière se fait dans des sites particuliers du noyau appelés compartiments de réplication et nécessite sept protéines virales pour qu'elle soit efficace. Ces protéines sont : BZLF1, BALF5, BMRF1, BALF2, BBLF4, BSLF1, BBLF2/3. De plus, certains facteurs cellulaires tels que les kinases cycline-dépendantes, les facteurs de réparation de l'ADN, les protéines chaperonnes et les isomérases jouent un rôle essentiel dans ce processus. Ensuite, se met en place l'expression des gènes tardifs ou *late* (L) codant des protéines virales structurales pour la formation des virions (Tsurumi et al., 2005). Ces protéines comprennent celles de la capside et les glycoprotéines de l'enveloppe (Kenney and Mertz, 2014).

Une fois la capside assemblée dans le noyau, le génome viral linéaire obtenu après la réplication et le clivage, entre à l'intérieur de la capside pour former la nucléocapside. Cette dernière acquiert un enveloppement par la membrane nucléaire interne suivi d'un désenveloppement par la membrane nucléaire externe, ce qui lui permet de sortir du noyau. Concernant les glycoprotéines de l'enveloppe virale, leur glycosylation commence dans le réticulum et continue dans l'appareil de Golgi. Ensuite, ces glycoprotéines s'accumulent dans les vésicules post-golgiennes et internalisent ultérieurement les nucléocapsides, en même temps que se forme le tégument.

Enfin, le virion est libéré dans l'espace extracellulaire suite à la fusion de la vésicule golgienne avec la membrane plasmique. L'ensemble se produit principalement dans les lymphocytes B mémoires lors de leur différenciation en plasmocytes. Les cellules infectées se dirigent ensuite vers les épithéliums muqueux, comme les amygdales ; il y a libération de particules virales dans la salive, ce qui favorise la transmission de l'EBV entre les individus.

Le cycle lytique permet, au final, l'amplification du génome viral d'un facteur 100 à 1000, aboutissant ainsi au maintien et à la diffusion de l'EBV.

b) Lors de la réactivation

Dans certains cas, la phase de latence de l'EBV est rompue de manière spontanée et permet l'entrée du virus dans le cycle productif.

In vivo, l'activation du cycle se fait par une stimulation antigénique des BCR (*B-Cell Receptor*) (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005) ou par la différenciation des cellules épithéliales infectées (Young et al., 1991; Al Tabaa et al., 2009).

Il a été démontré que la protéine ZEBRA (codée par le gène *BZLF1*) joue un rôle important dans le passage de l'état latent au cycle lytique (Grogan et al., 1987). Elle pourrait activer l'expression de la protéine Rta (codée par *BRLF1*) et agir de façon synergique avec cette dernière pour induire le cycle lytique (Ragoczy et al., 1998).

Au contraire, les protéines LMP-1 et LMP-2A sont capables d'inhiber la réactivation du virus (Fukuda and Longnecker, 2005).

Par ailleurs, la réactivation peut être induite assez facilement *in vitro* dans les lignées cellulaires immortalisées par l'EBV (en phase latente) et ceci en utilisant des composés chimiques comme l'acide butyrique associé aux esters de phorbol tel que le TPA (12-O-Tétradécanoyl-Phorbol 13- Acétate). Ce dernier est un activateur de la protéine kinase C (PKC) (Luka et al., 1986). L'activation peut être aussi induite par des agents physiologiques comme des ionophores calciques (Faggioni et al., 1986) et le TGF- β (*Transforming Growth Factor beta*) qui est un inducteur du cycle lytique dans des lignées de lymphome de Burkitt par un mécanisme dépendant de la protéine kinase ERK (*Extracellular signal-regulated Kinase*) (Fahmi et al., 2000). La stimulation du BCR de surface peut également réactiver le virus *in vitro* (Takada and Ono, 1989). Cette induction est plus ou moins intense selon les lignées cellulaires utilisées et aussi selon les agents (Gradoville et al., 2002). Parfois, des actions synergétiques de ces inducteurs peuvent être utilisées.

Tous ces agents induisent l'activation des gènes *BZLF1* et *BRLF1* et donc activent le cycle productif de l'EBV.

I.6.2. La latence virale

La latence virale est caractérisée par deux événements essentiels qui assurent le maintien du génome du virus dans la cellule : d'une part, l'inhibition du passage vers le cycle lytique et le maintien de la structure épisomale et d'autre part, l'expression des gènes de latence. Ces derniers codent pour les protéines LMP et EBNA, les ARN EBER et BART.

L'expression de ces gènes contribue aux propriétés d'immortalisation et de transformation de l'EBV en détournant la machinerie cellulaire afin de contrôler la croissance et la survie des cellules infectées.

1.6.2.1. Les différents programmes de latence

On distingue 5 types de latence en fonction des différentes protéines virales exprimées (**Figure 6**) :

- **Latence III** : cette forme est caractérisée par l'expression de toutes les protéines membranaires de latence LMP (LMP-1, LMP-2A et LMP-2B) et nucléaires EBNA (-1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP) ainsi que les ARN viraux EBER et BART et les microARN (Grywalska and Rolinski, 2015). Les promoteurs Cp et Wp initient l'expression de l'ensemble de ces protéines et ARN viraux. Les lymphomes des immunodéprimés (Yong et al., 1989) et les lignées cellulaires lymphoblastoïdes présentent cette latence. C'est le programme d'immortalisation de l'EBV lorsqu'il infecte les cellules B durant la primo-infection.

- **Latence II** : les protéines EBNA-1 et LMP (LMP-1, LMP-2A et LMP-2B) sont exprimées, toujours en présence des ARN EBER, BART et de quelques miARN. Le promoteur Qp est à l'origine de l'expression des protéines en latence II. Les carcinomes nasopharyngés, le lymphome de Hodgkin lorsqu'il est associé à l'EBV et le lymphome NK/T, à titre d'exemple, présentent cette latence (Busson et al., 1992; Deacon et al., 1993; Mesri et al., 2014).

- **Latence I** : elle est caractérisée par la répression des promoteurs Wp, Cp et ceux qui codent pour les protéines LMP (Sample et al., 1991; Schaefer et al., 1995a). Le promoteur Qp est à l'origine du profil d'expression des protéines en latence I. Durant cette latence, seule la protéine EBNA-1 est exprimée. Par contre, il est à noter la présence des ARN EBER, BART et des microARN BART (Marquitz et al., 2014). Elle est trouvée dans le lymphome de Burkitt ainsi que dans les cellules B mémoires en division (Hochberg et al., 2004; Grywalska and Rolinski, 2015).

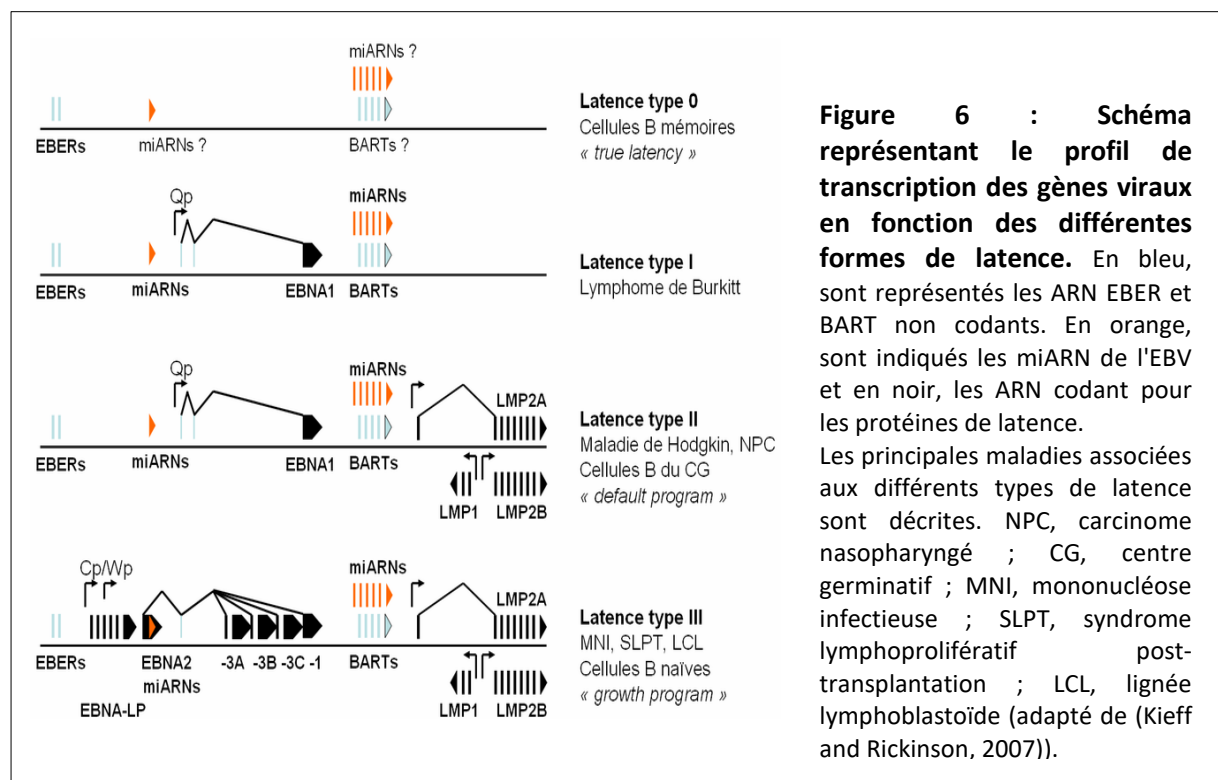
- **Latence 0** : elle est liée aux cellules B mémoires au repos, infectées par l'EBV. Aucune protéine virale n'y est exprimée. On trouve les ARN EBER et BART ainsi que des transcrits LMP-2A qui peuvent être présents sans production repérable de la protéine (Miyashita et al., 1997; Küppers, 2003; Shakhovich et al., 2006). Le virus peut donc persister durant toute la

vie de la personne infectée à l'abri du système immunitaire (Babcock et al., 1998). L'EBV peut échapper à la réponse immune anti-EBV, les ARN de LMP-2A étant peu immunogènes et non détectables par le système immunitaire de l'hôte. Il n'existe pas de pathologie associée à ce type de latence.

- **Latence atypique** : caractérisée par la dominance du promoteur Wp des EBNA par rapport au promoteur Cp (Hutchings et al., 2006). Les protéines EBNA-1, EBNA-3- (A, B, C) et une forme tronquée d'EBNA-LP sont exprimées, et l'absence de l'expression des protéines LMP a été notée. La protéine EBNA-2 n'est pas exprimée à cause de la délétion du gène correspondant (Bodescot et al., 1986). Les niveaux d'expression de ces protéines sont inférieurs à ceux retrouvés dans les cellules en programme de latence III.

Cette latence est décrite particulièrement dans des cas de lymphomes de Burkitt endémiques associés à l'EBV. Elle est retrouvée également dans la lignée cellulaire P3HR1 (Kelly et al., 2002).

Les cellules présentant cette latence ont montré une résistance accrue à l'apoptose (Kelly et al., 2005).

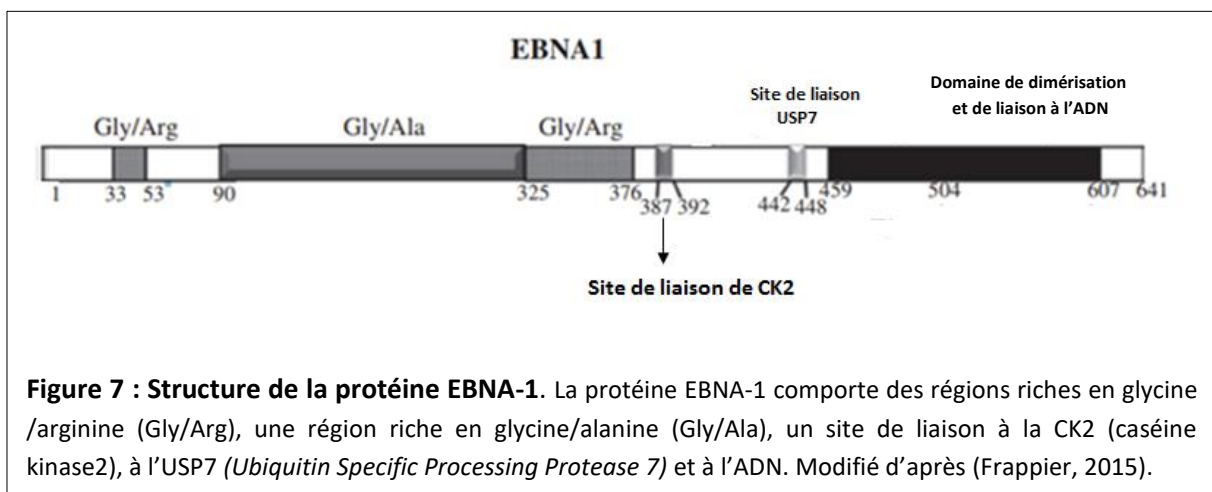


I.6.2.2. Les protéines de latence

I.6.2.2.1. Les protéines nucléaires EBNA

A. La protéine EBNA-1

La protéine EBNA-1 est codée par le cadre de lecture ouvert *BKRF1* qui contient la région répétée IR3. A cause du polymorphisme de cette région, EBNA-1 a un poids moléculaire variant entre 65 et 85 kDa selon les souches virales (Hennessy and Kieff, 1983). EBNA-1 est une phosphoprotéine nucléaire de 641 acides aminés. Elle comporte des domaines riches en Glycine/Arginine (Gly/Arg) et Glycine/Alanine (Gly/Ala), un site de liaison à l'USP7 (*Ubiquitin Specific Processing Protease 7*) et un domaine de dimérisation et de fixation à l'ADN (**Figure 7**).



La protéine EBNA-1 est exprimée dans toutes les cellules infectées par l'EBV, et est trouvée dans les latences I, II et III. Son expression est controversée dans la latence 0 (Babcock et al., 1999). L'ARN messager codant pour la protéine EBNA-1 a la particularité d'être transcrit à partir de quatre promoteurs viraux différents : Wp, Cp, Qp et Fp (Saha and Robertson, 2011).

Durant les latences I et II, où les promoteurs Wp et Cp sont éteints par méthylation, le promoteur Qp (sans boîte TATA) peut prendre la suite de la transcription (Schaefer et al., 1997), alors qu'aux stades initiaux de la latence III, la protéine EBNA-1 est transcrite à partir

du promoteur Wp puis à partir du promoteur Cp après circularisation du génome. Le promoteur Fp est actif pendant le cycle lytique (Schaefer et al., 1995b).

EBNA-1 est capable de se fixer à différents endroits du génome viral avec des affinités différentes (Jones et al., 1989). C'est pour la région FR de l'OriP qu'EBNA-1 a la plus forte affinité, suivie de l'élément DS et enfin du promoteur Qp. Tous les sites de fixation d'EBNA-1 contiennent plusieurs copies d'une séquence palindromique de 18 pb (Rawlins et al., 1985; Ambinder et al., 1990;). Toutes les copies de ces séquences d'ADN ne sont pas identiques dans le génome de l'EBV mais contiennent quelques variations pouvant ainsi expliquer les différences d'affinité observées pour l'interaction avec EBNA-1.

La protéine EBNA-1 est essentielle pour le maintien et la réplication de l'épisome viral (Yates et al., 1984). Ce maintien est réalisé par la fixation conjointe d'EBNA-1 sur l'origine de réplication virale du plasmide, OriP et sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose (Leight and Sugden, 2000; Wu et al., 2002). De plus, la protéine EBNA-1 joue un rôle dans la transcription des protéines EBNA à partir du promoteur Cp (Reisman and Sugden, 1986; Kennedy and Sugden, 2003).

Durant ces dernières années, il est devenu évident que les fonctions d'EBNA-1 ne sont pas limitées à ses rôles sur les épisomes de l'EBV. L'EBNA-1 modifie également l'environnement cellulaire de différentes façons qui contribuent à la survie et à la prolifération des cellules ainsi qu'à la persistance virale. Elle peut affecter plusieurs voies de signalisation. D'abord, il a été démontré que son expression est liée à l'augmentation de la phosphorylation de STAT-1 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) et à sa localisation nucléaire en réponse à l'interféron- γ (IFN- γ) (Wood et al., 2007). Deuxièmement, EBNA-1 inhibe la voie de signalisation de TGF- β . Cet effet peut être dû à l'augmentation du renouvellement de SMAD-2 entraînant une diminution des niveaux de complexes de SMAD nécessaires à l'induction de la transcription de TGF- β 1 (Wood et al., 2007; Flavell et al., 2008). Troisièmement, Valentine et ses collaborateurs ont démontré que la protéine EBNA-1 peut inhiber la voie canonique de NF- κ B (Facteur Nucléaire – κ B) dans des lignées cellulaires de carcinomes nasopharyngés et cela en inhibant la phosphorylation de IKK (I κ B Kinase)- α/β (Valentine et al., 2010).

D'autre part, EBNA-1 pourrait conférer au virus la propriété d'échappement au système immunitaire *via* la région répétée Gly/Ala. Cette dernière peut varier de taille en fonction des souches d'EBV et joue un rôle important dans les interactions intramoléculaires. Cette région empêche la présentation de la protéine EBNA-1 par le CMH-I aux lymphocytes T cytotoxiques CD8+ (Levitskaya et al., 1995), ce qui inhibe la réponse immunitaire. Elle peut aussi inhiber la dégradation d'EBNA-1 par le protéasome (Levitskaya et al., 1997). La méthylation de certaines arginines permettrait la localisation au niveau des nucléoles. La phosphorylation de sérines régule les propriétés transactivatrices et celles du maintien du génome viral (Shire et al., 2006).

Par ailleurs, EBNA-1 est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Altmann et al., 2006). Elle peut contribuer au remaniement des processus cellulaires, tels que la diminution de l'apoptose et l'augmentation de la survie cellulaire dans certaines cellules tumorales EBV-positives (Kennedy et al., 2003). Elle est aussi responsable de l'augmentation de la transcription du gène de la survivine, inhibiteur de l'apoptose cellulaire, ce qui contribue à la survie des lymphocytes B immortalisés par l'EBV (Lu et al., 2011).

L'expression d'EBNA-1 dans des cellules de NPC et de carcinome gastrique a montré une réduction de l'accumulation de p53 en réponse aux dommages de l'ADN et ainsi une réduction de l'apoptose (Cheng et al., 2010; Sivachandran et al., 2008, 2012). Ceci favorise la survie cellulaire des cellules épithéliales infectées par l'EBV.

Aussi, deux études ont prouvé l'implication d'EBNA-1 dans l'augmentation du stress oxydatif, ce qui provoque ainsi l'accumulation des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Gruhne et al., 2009; Kamranvar and Masucci, 2011).

B. La protéine EBNA-2

EBNA-2 est codée par le cadre de lecture ouvert *BYRF1* et est associée à la latence III. Elle est la première protéine du virus à être produite après l'introduction du génome viral dans le noyau de la cellule hôte (Allday et al., 1989). La transcription du gène *EBNA-2* est initiée à partir des promoteurs Wp et Cp (Bodescot et al., 1986).

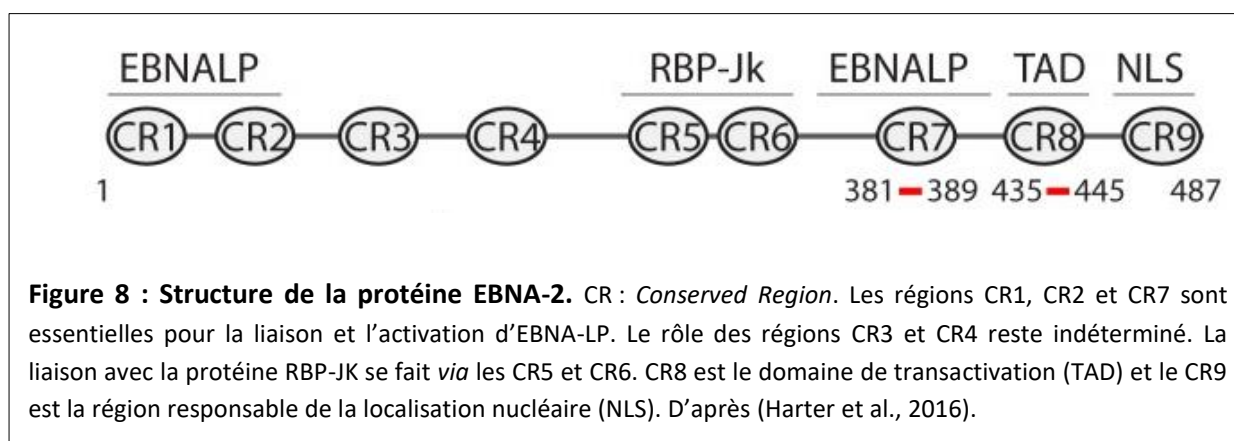
Après avoir séquencé la protéine EBNA-2 provenant de différentes souches d'EBV, il a été démontré l'existence de deux variants : EBNA-2A et EBNA-2B qui diffèrent selon leur

taille ; EBNA-2A comprend 487 acides aminés, tandis qu'EBNA-2B en compte 443 (Addinger et al., 1985), ce qui permet de définir deux souches d'EBV, EBV-1 et EBV-2. Grâce aux différences présentes au sein du gène *EBNA-2*, il a été attribué à l'EBV de type 1 la propriété d'être plus transformant *in vitro*.

La protéine EBNA-2 est une phosphoprotéine nucléaire. Elle présente en position amino-terminale un domaine de dimérisation DIM (aa 1 à 57) chargé négativement (Zimber-Strobl and Strobl, 2001), une région riche en proline (aa 58 à 97) et une région variable selon le type de virus qui est à l'origine des variants (aa 135-280 pour la forme la plus longue EBNA-2A). C'est grâce à cette région N-terminale que l'EBNA-2 possède une forme homodimérique *in vivo et in vitro*.

La partie carboxy-terminale comprend 4 domaines : un domaine d'interaction avec la protéine CBF1/RBP-Jk (*Centromere Binding Factor 1/Recombination-Binding Protein Jkappa*), une région riche en Arginine-Glycine (RG, aa 341 à 355), un domaine de transactivation (TAD, aa 437 à 475) et le signal de localisation nucléaire (NLS, aa 477 à 483) (Horvath and Schubach, 1993).

D'une autre manière, la protéine EBNA-2 comporte 9 régions conservées (CR pour *Conserved Regions*). La fonction de chacune de ces régions est décrite dans la **figure 8**.



La liaison d'EBNA-2 à l'ADN ne se fait pas directement mais par recrutement des protéines de la machinerie transcriptionnelle *via* son domaine de transactivation.

La protéine adaptatrice la plus étudiée pour EBNA-2 est le facteur de transcription CBF1/RBP-J κ , qui est décrit comme une protéine effectrice de la voie Notch (Henkel et al., 1994; Zimmer-Strobl et al., 1994).

La voie Notch est une voie de signalisation qui repose sur un récepteur transmembranaire, la protéine Notch, contrôlant de nombreux processus cellulaires parmi lesquels la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

La protéine EBNA-2, *via* l'interaction du facteur RBP-J κ avec des sites de fixation à l'ADN, joue le rôle d'un puissant activateur de la transcription des gènes viraux et cellulaires. Elle active la transcription des protéines virales de latence, LMP-1 et LMP-2 ainsi que le promoteur Cp (promoteur contrôlant l'expression de tous les EBNA) (Abbot et al., 1990; Wang et al., 1990; Zimmer-Strobl et al., 1991). Elle permet aussi la régulation des antigènes spécifiques des cellules B tels que CD21, CD23 (Cordier et al., 1990; Ling et al., 1994) ainsi que des proto-oncogènes c-Fgr (kinase cellulaire), c-Myc (*Cellular Myelocytomatosis*) contribuant à la croissance cellulaire.

La protéine EBNA-2 augmente aussi l'expression des facteurs de transcription BATF (*Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*), permettant ainsi l'inhibition de l'entrée des cellules en cycle lytique *via* la protéine Zta (Johansen et al., 2003).

D'autre part, EBNA-2 est l'une des protéines virales indispensables à l'immortalisation des lymphocytes B quiescents *in vitro*. L'incapacité de la lignée P3HR-1, souche virale qui comporte une délétion du gène codant pour la protéine EBNA-2 ainsi que des deux derniers exons codant pour EBNA-LP, à immortaliser des cellules B *in vitro* fut la première indication d'un rôle essentiel d'EBNA-2 (Rabson et al., 1982; Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989). La restauration du gène codant pour EBNA-2 dans cette souche P3HR-1 permet à nouveau l'immortalisation des cellules B (Cohen et al., 1989).

En outre, d'autres fonctions que celle de facteur de transcription ont été décrites pour la protéine EBNA-2. Il a été montré que la protéine EBNA-2, en coopération avec EBNA-LP, permet aux cellules infectées de passer de la phase G0 à G1 du cycle cellulaire, notamment grâce à l'activation de la cycline D2 (Sinclair et al., 1994; Peng et al., 2005).

En plus, elle peut jouer un rôle potentiel dans la maturation des ARNm *via* son interaction avec une protéine de la famille des protéines DEAD-box qui est la protéine DEAD-

box DP103 (Grundhoff et al., 1999), et un rôle anti-apoptotique par son interaction avec la protéine Nur77 (Lee et al., 2002).

Dans une étude récente, il a été montré qu'EBNA-2 est essentielle à la croissance des cellules lymphoblastoïdes et la survie cellulaire et ceci suite à son association à une surexpression des chimiokines CCL3 (*Chemokine Ligand 3*) et CCL4 (*Chemokine Ligand 4*) dans les cellules de lymphome. Cette régulation positive conduit à l'activation des voies Btk (*tyrosine kinase Bruton*) et NF-κB et aussi à une résistance à la doxorubicine utilisée pour traiter les lymphomes B (Kim et al., 2017).

C. La protéine EBNA-LP

La protéine EBNA-LP (*Leader Protein*), est codée par le cadre de lecture ouvert *BWRF*. Sa région N-terminale est composée de répétitions en tandem de 66 acides aminés codés par deux exons W1 (de 22 aa) et W2 (44 aa) provenant de la région IR1. Pour la région C-terminale, elle est codée par deux exons uniques Y1 et Y2 et est formée de 45 acides aminés (Bodescot et al., 1984; Ling et al., 2005) (**Figure 9**).

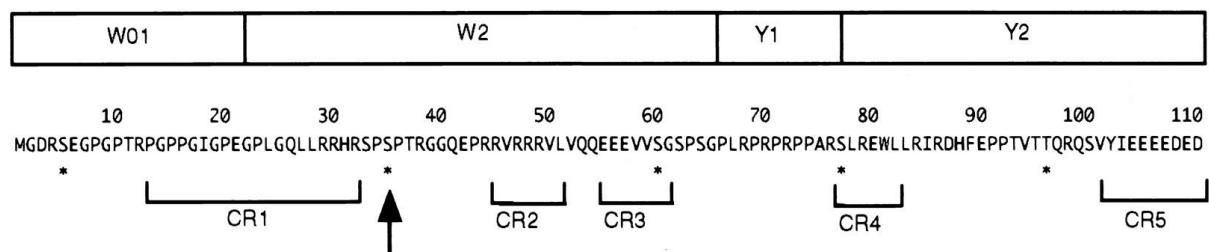


Figure 9 : Schéma de la protéine EBNA-LP. La séquence d'acides aminés prédite de l'isoforme EBNA-LP contenant une répétition W. Les structures d'exons correspondantes sont indiquées au-dessus de la séquence. Les régions conservées (CR1 à CR5) sont indiquées au-dessous de la séquence. Les sérines ou les thréonines conservées sont indiquées par des astérisques. Le principal site de phosphorylation identifié dans cette étude est présenté par une flèche. Modifié d'après (Yokayama et al., 2001).

Elle est la première protéine à être exprimée avec EBNA-2 à partir du promoteur Wp lors de l'infection.

La coopération d'EBNA-LP avec EBNA-2 potentialise les effets de cette dernière dans l'activation de la transcription et la régulation du cycle cellulaire, ce qui permet de suggérer un rôle d'EBNA-LP dans l'immortalisation des cellules B (Harada and Kieff, 1997; Nitsche et

al., 1997) et dans la transition G0 (quiescence) /G1 (entrée dans le cycle de division) (Sinclair et al., 1994; Kashuba et al., 2003).

Cette activité co-activatrice est régulée par la phosphorylation de la protéine EBNA-LP par la protéine kinase cellulaire CDK-1 au niveau des résidus sérine S35 et S63 des domaines W1 et W2 (Yokoyama et al., 2001; Kato et al., 2003).

EBNA-LP est généralement située au niveau nucléaire. Cependant, elle peut également être retrouvée dans le cytoplasme (Garibal et al., 2007).

Concernant le pouvoir transformant, il a été démontré qu'EBNA-LP n'est pas essentielle, vu qu'après avoir incorporé son gène chez P3HR-1, souche incapable de transformer les cellules B *in vitro* à cause de la délétion du gène EBNA-2 et des deux derniers exons d'EBNA-LP, P3HR-1 reste toujours non transformant tandis que la restauration du gène EBNA-2 permet à nouveau l'immortalisation *in vitro* (Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989).

Une étude ultérieure menée en 1991 a montré un rôle important des exons Y1 et Y2 dans le processus d'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Mannick et al., 1991). Pour le cycle cellulaire, EBNA-LP est capable d'interagir avec p14^{ARF}, protéine qui inhibe la dégradation de p53, arrête le cycle cellulaire et induit l'apoptose. Cette interaction permet de neutraliser l'effet de p14^{ARF}, ce qui diminue l'expression de p53 et donc favorise la survie cellulaire (Kashuba et al., 2003).

EBNA-LP pourrait interagir aussi avec MDM-2 (*Murin Double Minute 2*), qui empêche à son tour la poly-ubiquitination de p53 provoquant ainsi sa dégradation.

Ces deux mécanismes permettent à EBNA-LP de participer à la survie des cellules immortalisées par l'EBV.

D. Les protéines EBNA-3 (EBNA-3A/-3B/-3C)

Les protéines EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C (ou appelées respectivement EBNA-3, EBNA-4 et EBNA-6) sont codées par trois gènes du fragment BamHI *BLRF3/BERF1*, *BERF2a/BERF2b* et *BERF3/BERF4* localisés en tandem sur le génome de l'EBV, ces gènes pourraient avoir une origine commune (Hennessy et al., 1986).

Elles sont transcrites à partir du promoteur Cp ou Wp (Bodescot et al., 1986) comme les autres protéines EBNA.

Les EBNA-3 sont riches en acides aminés chargés ($\geq 20\%$), ce qui les rend hydrophiles. De plus, la présence des résidus arginine et lysine en grande proportion favorise leur localisation nucléaire et la présence des acides aminés leucine, isoleucine ou valine leur confèrent la propriété d'être sous la forme homo/hétéro-dimère.

En comparant les deux types d'EBV, EBV-1 et EBV-2, les séquences protéiques d'EBNA-3A, -3B et -3C comportent respectivement 944, 938 et 992 acides aminés pour le premier type et 925, 946 et 1069 acides aminés pour le deuxième et la similitude d'allèles est de 84, 80 et 72% respectivement, ce qui permet de considérer que ces protéines, tout comme EBNA-2, sont à l'origine du polymorphisme entre EBV-1 et EBV-2.

Comme EBNA-2, les EBNA-3 ne se fixent pas directement sur l'ADN et pourraient agir *via* l'interaction avec des protéines cellulaires capables de se lier à l'ADN comme CBF1/ RBP-Jk (Robertson et al., 1995, 1996).

Premièrement, elles sont connues pour être des facteurs transcriptionnels impliqués dans la régulation de gènes cellulaires et viraux. Elles pourraient inhiber le recrutement d'activateurs de transcription comme EBNA-2 en déplaçant CBF1/RBP-Jk de sa cible d'ADN, jouant ainsi le rôle d'un répresseur transcriptionnel (Robertson et al., 1996).

D'autre part, il a été décrit que les EBNA-3A et -3C peuvent agir sur les promoteurs latents et inhibent leur activation par EBNA-2. EBNA-3C peut aussi réprimer spécifiquement le promoteur Cp, indépendamment d'EBNA-2 (Radkov et al., 1999) montrant ainsi leur capacité de régulation au niveau de l'expression virale (Johannsen et al., 1996).

A côté de leur rôle transcriptionnel, les EBNA-3 peuvent influencer sur les capacités métastatiques des cellules infectées par l'EBV ainsi que sur leur prolifération et leur cycle cellulaire.

Les EBNA-3 sont indispensables pour la persistance du virus dans les cellules B, et peuvent induire ainsi la lymphomagenèse (Allday et al., 2015).

Dans les LCL *in vitro*, EBNA-3C est associée à c-Myc permettant la stabilisation de la protéine c-Myc, modulant ainsi son activité transcriptionnelle et donc augmentant la transcription des gènes cibles de c-Myc (Bajaj et al., 2008). Par ailleurs, les protéines EBNA-

3A et EBNA-3C sont importantes à l'immortalisation des lymphocytes B lors de l'obtention de LCL (Tomkinson et al., 1993). Ces deux variants sont les principaux acteurs de la résistance aux médicaments cytotoxiques, et agissent comme inhibiteurs du BCL2L11 (*Bcl-2-like Protein 11*), une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 (Anderton et al., 2008). En 2015, Ohashi et son équipe ont montré que l'association entre ces variants et le domaine WDR48 (Répétition WD contenant la protéine 48) est essentielle pour la prolifération des LCL (Ohashi et al., 2015). Pour EBNA-3B, la délétion complète de son exon ne perturbe ni la croissance ni l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Chen et al., 2005).

Les protéines EBNA-3 interagissent avec de nombreuses protéines cellulaires régulatrices comme pRb (*Protein Retinoblastoma*) et p27^{KIP1} (inhibiteur de cycline kinase dépendante) (Parker et al., 2000) facilitant la progression entre les différentes phases du cycle cellulaire. De même, EBNA-3C empêche la dégradation de la protéine MDM2, induisant ainsi la dégradation de p53 et favorisant la prolifération cellulaire (Saha et al., 2009). EBNA-3 est aussi décrite comme un acteur nécessaire pour générer des cellules T anti-EBV spécifiques, avec une cytotoxicité élevée (Wang et al., 2014).

I.6.2.2.2. Les protéines LMP

a. La protéine LMP-1

La protéine LMP-1 est considérée comme l'oncogène principal du virus EBV. Elle joue un rôle majeur dans les processus d'immortalisation et de transformation des cellules B *in vitro* par l'EBV (Kaye et al., 1993).

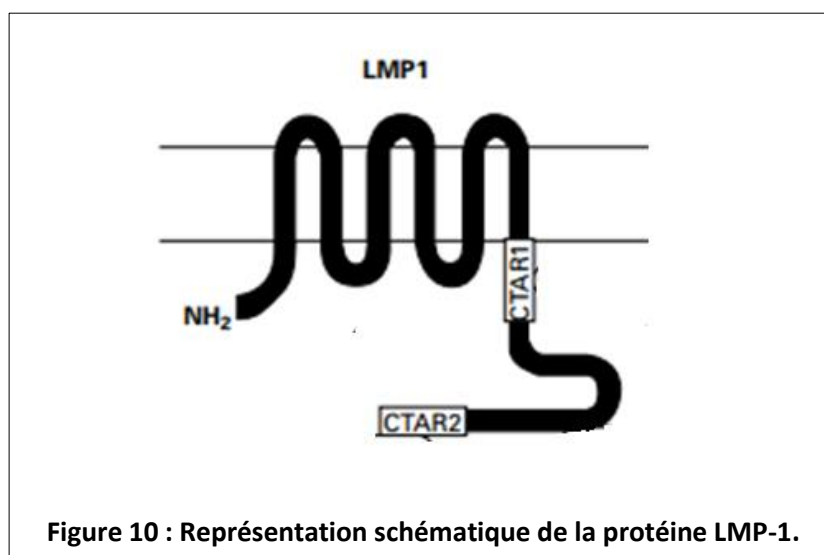
Wang et ses collaborateurs ont pu montrer la capacité des cellules exprimant LMP-1 à induire la formation de tumeurs après leur injection dans des souris « nude » (Wang et al., 1985).

LMP-1 est codée par le cadre de lecture ouvert *BNLF1* et est transcrite dans le sens L (de U5 à U1). L'extrémité C-terminale du gène *LMP-1*, en particulier la partie comprise entre les nucléotides 168225 et 168375 est connue pour être l'objet de nombreuses mutations (d'une seule base) qui ont eu lieu de façon indépendante à plusieurs reprises au cours de l'évolution des variants du virus EBV (Banko et al., 2012).

Des délétions de 30 et/ou de 15 pb ont notamment été décrites dans la terminaison carboxyle des lignées d'EBV issues de lymphomes de Hodgkin et dans d'autres syndromes lymphoprolifératifs ; ces délétions semblent associées à des virus plus oncogènes (Miller et al., 1994) et jouent un rôle dans l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire (Hu et al., 2000). Contrairement à la délétion de 30 pb que l'on retrouve fréquemment, principalement dans le NPC, la délétion de 69 pb qui correspond aux acides aminés 333 à 355 décrite par Knecht et ses collaborateurs en 1993, reste très rare (Knecht et al., 1993).

La LMP-1 est une protéine membranaire de 386 acides aminés, composée :

- d'une région N-terminale intracytoplasmique (24 aa),
- de six domaines transmembranaires hydrophobes de 20 aa chacun, structurés en hélice alpha et reliés entre eux par des boucles de 8 à 10 acides aminés (Fennewald et al., 1984; Hennessy et al., 1984),
- et d'une queue C-terminale intra-cytoplasmique (200 aa), constituée de deux régions essentielles appelées CTAR (*Carboxy-Terminal Activating Regions*) ou TES (*Transformation Effector Site*) : CTAR-1 (aa 187 à 231) et CTAR-2 (aa 352 à 386) (Huen et al., 1995 ; Gires et al., 1999) (**Figure 10**).



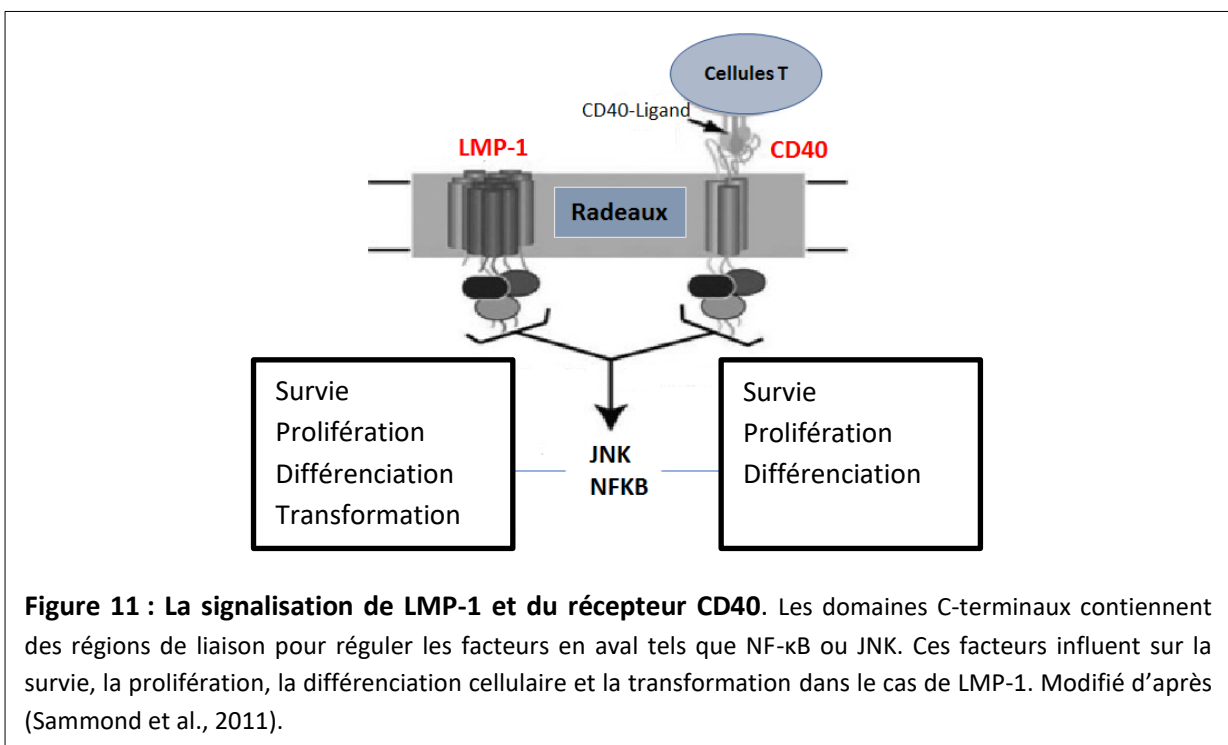
Il a été montré que la partie N-terminale cytoplasmique est indispensable pour la bonne orientation de LMP-1 dans la membrane ce qui est nécessaire à son agrégation (Izumi et al.,

1994a ; Coffin et al., 2001). Elle permet aussi l'ubiquitinylation et ainsi la dégradation de la protéine LMP-1 par le protéasome (Aviel et al., 2000).

Concernant les régions transmembranaires, elles sont importantes pour la localisation de LMP-1 dans les radeaux lipidiques ainsi que pour l'oligomérisation et la signalisation de la protéine (Higuchi et al., 2001; Yasui et al., 2004). En plus, ces régions pourraient entraîner une altération morphologique cellulaire suite à une réorganisation du cytosquelette (Puls et al., 1999).

Une analyse mutationnelle de la protéine LMP-1 *in vitro* a montré le rôle important du domaine transmembranaire 1 (TM1) et de la queue C-terminale de LMP-1 dans l'immortalisation des cellules B ainsi que dans la prolifération cellulaire et l'inhibition de l'expression de certains gènes cellulaires (Kaykas and Sugden, 2000), au contraire de la partie N-terminale qui, après sa délétion, n'a pas empêché la transformation (Izumi et al., 1994b).

LMP-1 est décrite comme un récepteur constitutivement actif (ligand indépendant) et est connue comme un équivalent du récepteur CD40, récepteur appartenant à la famille TNF (*Tumor Necrosis Factor*), car les deux ont des fonctions homologues (Eliopoulos and Rickinson, 1998) (**Figure 11**). En se basant sur cette propriété, LMP-1 a pu partiellement substituer le CD40 chez des souris transgéniques dépourvues de CD40 (Uchida et al., 1999 ; Hömig-Hölzel et al., 2008).



La protéine LMP-1 peut interagir avec des protéines cellulaires, par lesquelles elle pourrait affecter la croissance et la différenciation cellulaires ainsi que l'apoptose. Cette interaction se fait *via* les domaines CTAR-1 et CTAR-2 (Soni et al., 2007), montrant l'importance de ces derniers dans l'immortalisation des cellules B (Izumi et al., 1997, 1999). CTAR-1 et CTAR-2 recrutent, tout comme CD40, les TRAF (*TNF-receptor associated factor*) par interaction directe (cas de CTAR-1) (Devergne et al., 1996) ou indirecte *via* les TRADD (*TNF Receptor Associated Death Domain*), RIP (*receptor-interacting protein*) et BS69 dans le cas de CTAR-2 (**Figure 12**) (Kilger et al., 1998 ; Izumi et al., 1999).

Ensuite, la famille des TRAF recrute, en aval, des molécules de signalisation formant ainsi des complexes d'hétéromères, ce qui induit l'activation de différentes voies de signalisation cellulaire. Il s'agit essentiellement des voies de NF- κ B, de PI3K (*Phosphatidylinositol 3 Kinase*), de p38 MAPK (*p38 Mitogen Activated Protein Kinase*), de JNK (*c-Jun amino-terminal Kinase*), et d'ERK (Mosialos et al., 1995; Devergne et al., 1996; Uchida et al., 1999; Hömig-Hölzel et al., 2008; Xie et al., 2008).

LMP-1 pourrait aussi activer le facteur de transcription STAT par son interaction avec la protéine JAK3 (*Janus Activated Kinase*) (Gires et al., 1999; Higuchi et al., 2002; Shair et al., 2007).

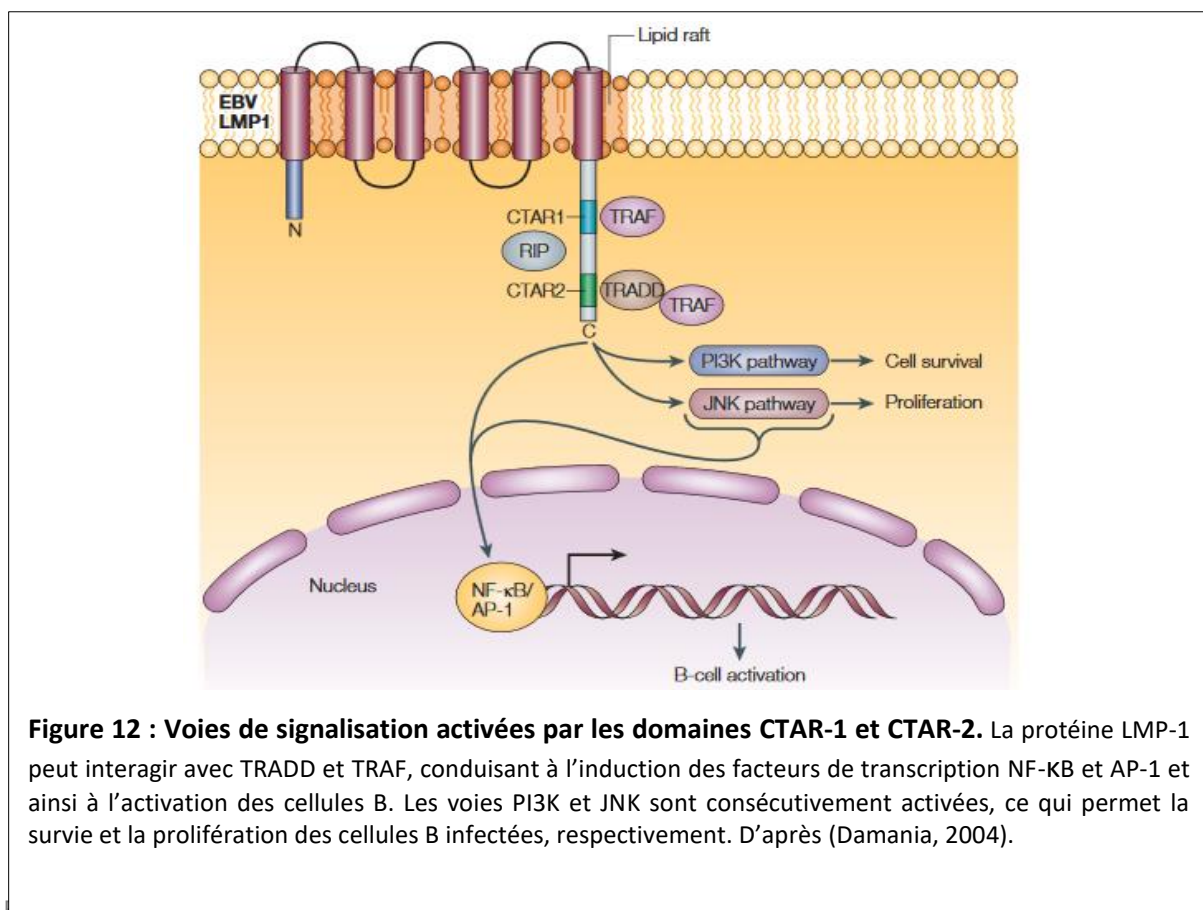


Figure 12 : Voies de signalisation activées par les domaines CTAR-1 et CTAR-2. La protéine LMP-1 peut interagir avec TRADD et TRAF, conduisant à l'induction des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 et ainsi à l'activation des cellules B. Les voies PI3K et JNK sont consécutivement activées, ce qui permet la survie et la prolifération des cellules B infectées, respectivement. D'après (Damania, 2004).

L'activation de ces différentes voies cellulaires est responsable de toutes les conséquences phénotypiques dues à l'expression de LMP-1.

Par exemple, dans les lymphocytes B infectés par l'EBV, l'expression de LMP-1 induit une agrégation des lymphocytes B, une augmentation de l'expression des marqueurs d'activation des cellules B (CD21, CD23, CD80, CD83, CD30, CD39, CD40 et CD44), des molécules d'adhésion qui servent à l'activation des cellules immunitaires (ICAM-1 « *InterCellular Adhesion Molecule* », LFA-1 et LFA-3 « *Lymphocyte Function Associated Antigen* »), des antigènes du CMH-I (Zhang et al., 1994), du récepteur de la transferrine et de la vimentine ainsi que de l'interleukine de type 10 (Birkenbach et al., 1989; Nakagomi et al., 1994).

Elle peut aussi augmenter l'expression des chimiokines CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, IP10 (*Interferon-Inducible Protein 10*), d'où le recrutement des cellules T et NK pour l'élimination des cellules infectées (Nakayama et al., 2004). Cependant, la protéine LMP-1 pourrait aider à l'échappement du système immunitaire et cela en contrôlant l'expression de CCL17 et CCL22 (Nakayama et al., 2004).

En outre, la protéine LMP-1 pourrait jouer un rôle dans la protection des cellules contre l'apoptose en induisant l'expression des gènes anti-apoptotiques *bcl2* (*B-cell lymphoma 2*), *mcl-1* (*Myeloid cell leukemia 1*) et *A20* (Fries et al., 1996).

Il est important de noter ici que les complexes de signalisation engagés par LMP-1 peuvent dépendre du type cellulaire, ceci est à prendre en compte pour l'étude des pathologies associées à l'EBV.

Notons aussi que LMP-1 peut contribuer au pouvoir métastatique des cellules infectées. Son action se situe à 3 niveaux :

- l'induction de certains facteurs angiogéniques : HIF1 α , VEGF, FGF2, COX2 (A et al., 2008).
- l'inhibition de l'expression des suppresseurs de métastases tels que RECK1 (*RE version inducing Cysteine rich protein with Kazal motifs 1*) et de l'E-cadhérine (Hayashi et al., 2003).
- la régulation de l'expression de métalloprotéases MMP (*Matrix Metallo Proteases*) comme MMP9 (Muroso et al., 2000), ou MMP1 qui sont essentielles à la réorganisation et à la dégradation de la matrice extracellulaire (collagène) qui précèdent l'invasion cellulaire ainsi que la régulation de l'expression de l'activateur du plasminogène de type urokinase (*uPA*, *urokinase-type Plasminogen Activator*) et la mucine MUC1 qui paraissent jouer un rôle important dans ce processus (Park et al., 2000).

Plus récemment, il a été découvert que LMP-1 agit comme molécule modulatrice de l'adhésion cellulaire *via* la régulation de la signalisation de l'activine-A/TGF- β et de l'intégrine β 1 (Morris et al., 2016).

Une nouvelle propriété concernant l'oncogénicité de LMP-1 a été mise en évidence par l'équipe de He en 2016, c'est la régulation positive de l'expression de la protéine TAZ, protéine essentielle pour la prolifération des cellules et la transition épithélio-mésenchymateuse (He et al., 2016).

Une forme tronquée de LMP-1, appelée LyLMP-1, peut être trouvée dans le virion durant la phase tardive du cycle lytique. Cette forme est détectée au cours de la primo-infection par le virus et aussi durant sa réactivation (Erickson and Martin, 1997). Le domaine amino-terminal ainsi que les quatre premiers domaines transmembranaires y sont délétés. LyLMP-1 est traduite à partir d'un site d'initiation localisé au niveau de la méthionine 129 (129Met) et est décrite comme étant non oncogénique dans les cellules épithéliales. Elle est capable d'inhiber la voie de signalisation NF- κ B normalement induite par la forme LMP-1 sauvage. Elle inhibe donc les propriétés oncogéniques de LMP-1 et diminue sa demi-vie (Erickson and Martin, 2000; Pandya and Walling, 2006).

L'expression de LMP-1 est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients atteints de lymphomes non-hodgkiniens, ce qui n'est pas encore prouvé dans le cas de lymphomes hodgkiniens (Mao et al., 2013). Plusieurs équipes ont essayé de cibler cette protéine vu son pouvoir oncogène majeur. Récemment, une étude préclinique prometteuse réalisée sur un modèle murin a prouvé qu'un vaccin thérapeutique ciblant la protéine LMP-1 pourrait supprimer la croissance tumorale et les métastases *in vivo* (Lin et al., 2017).

b. Les protéines LMP-2A/2B

Les protéines LMP-2 (LMP-2A et LMP-2B) encore appelées protéines terminales TP1 et TP2 sont codées par le même gène mais présentent un épissage alternatif. La transcription de *LMP-2A* ne peut se faire que lorsque le génome est sous forme circulaire car elle est initiée au niveau des régions terminales répétées et que le gène est réparti sur les deux extrémités du génome. Les protéines LMP-2 sont formées de trois domaines :

- un domaine cytoplasmique N-terminal qui est délété de 119 acides aminés dans le cas de la protéine LMP-2B,

- un domaine transmembranaire, avec 12 segments, qui localise les LMP-2 dans les membranes cellulaires,
- et un domaine C-terminal de 27 acides aminés qui agit sur l'homo/hétéro dimérisation des isoformes de la protéine LMP-2.

Ces protéines s'associent sous forme d'agréats, au sein de la membrane plasmique des lymphocytes B infectés par le virus.

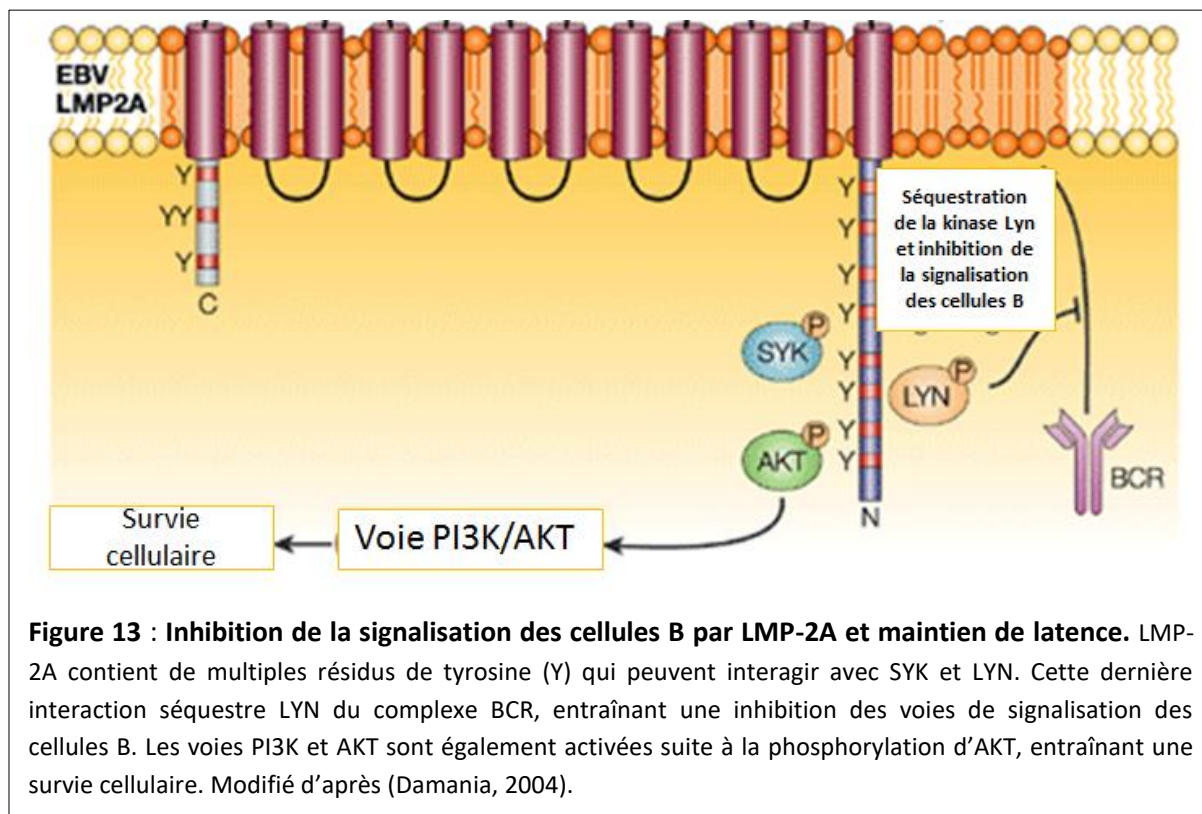
Les protéines LMP-2 sont exprimées dans de nombreuses tumeurs malignes associées à l'EBV. Elles sont co-localisées avec LMP-1, avec laquelle elles peuvent interagir.

Le domaine N-terminal constitue la région signalisatrice de LMP-2. Il contient des régions riches en proline et tyrosine (domaines PY) pouvant se lier au domaine WW de l'E3 ubiquitine ligase (Winberg et al., 2000), ce qui permet l'ubiquitination de la partie N-terminale de molécules impliquées dans sa signalisation et leur dégradation *via* le protéasome. Par conséquent, LMP-2A assure un rétrocontrôle négatif de sa propre signalisation (Young and Rickinson, 2004).

Le domaine N-terminal contient aussi un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) qui se lie à des protéines contenant un domaine SH2 comme les tyrosines kinases Lyn et Syk agissant normalement lors de la signalisation du BCR (**Figure 13**).

LMP-2A, ayant ce domaine, est capable alors de moduler la signalisation cellulaire entraînant ainsi une activation basale des lymphocytes B et une dégradation des kinases cellulaires conduisant à la régulation négative des voies normales de signalisation des lymphocytes B (Dykstra et al., 2001). Ces deux processus apparemment contradictoires permettent à l'EBV d'établir et de maintenir la latence.

La protéine LMP-2A mime le BCR et donne un signal de survie aux lymphocytes B ce qui leur permet d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection *in vivo* dans les centres germinatifs (Mancao and Hammerschmidt, 2007). En effet, LMP-2A active de manière constitutive les voies PI3K/Akt et PI3K/Ras associées à la survie cellulaire. La voie de signalisation PI3K/Akt peut inhiber l'apoptose induite par TGF- β (Fukuda and Longnecker, 2007) et induire l'expression de l'interleukine 10 (Incrocci et al., 2013).



Son interaction avec les protéines MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) a été prouvée, mais sa fonction est inconnue (Panousis and Rowe, 1997).

LMP-2A peut bloquer la translocation du BCR dans les radeaux lipidiques et aussi l'internalisation du complexe BCR/ antigène suite à sa localisation dans ces micro-domaines (Dykstra et al., 2001).

Enfin, LMP-2A peut inhiber la mobilisation du calcium et donc la réactivation du cycle viral induite par la liaison d'un ligand avec le BCR, ce qui procure la persistance de l'EBV en phase latente dans les lymphocytes B (Miller et al., 1994).

Alors que ses propriétés antigéniques peuvent être utiles dans le développement de l'immunité spécifique à cette protéine, les motifs N-terminaux de LMP-2A fournissent également une base pour cibler les kinases cellulaires modulées par LMP-2A, dans le développement de stratégies de traitement.

L'inhibition de l'expression de la protéine LMP-2A par un système lentiviral permet la diminution de la prolifération de cellules issues de carcinome gastrique *in vitro* (Wang et al., 2017).

En ce qui concerne la protéine LMP-2B, elle est beaucoup moins étudiée. Elle pourrait moduler l'agrégation de LMP-2A et contrôler négativement ses fonctions pour prévenir le passage de la phase latente à la phase lytique (Longnecker, 2000; Rechsteiner et al., 2008).

I.6.2.2.3. Les ARN et microARN viraux

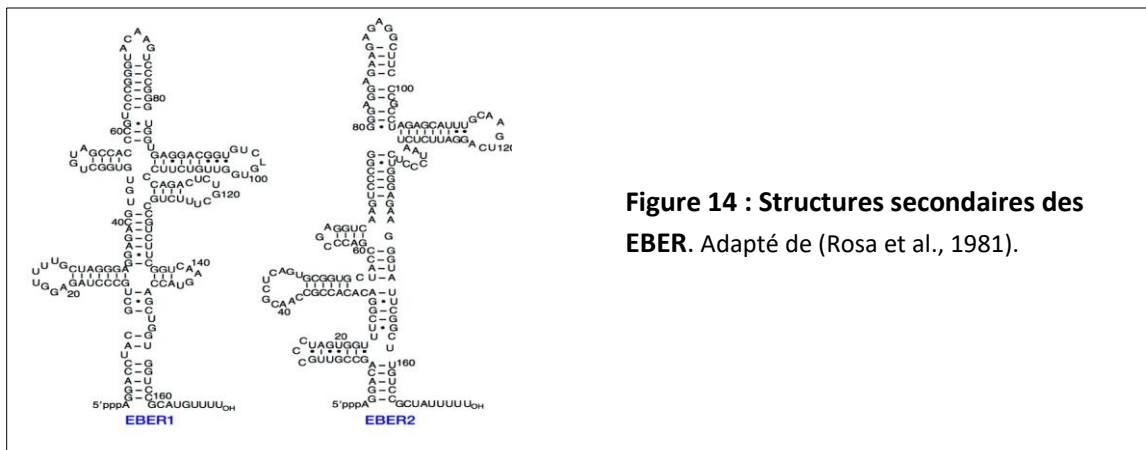
Les ARN viraux de latence sont les EBER, les BART, les miBART et les miBHRF1 (miARN exprimés à partir de deux régions BamH1-A et BHRF1 du génome de l'EBV) (Moss et al., 2014).

i. Les ARN EBER

Les ARN EBER-1 et -2 sont des petits ARN non codants et non polyadénylés, respectivement de 167 et 172 nucléotides (Rosa et al., 1981 ; Glickman et al., 1988). Ils sont transcrits préférentiellement par l'ARN polymérase III au niveau de la région BamHI-C du génome viral (Rymo, 1979). Cette polymérase synthétise normalement les ARN de transfert cellulaire.

Les EBER sont les transcrits viraux les plus abondants dans des cellules infectées par l'EBV. Ils représentent environ un million de copies par cellule (Arrand and Rymo, 1982; Alfieri et al., 1991) et sont très abondants dans toutes les latences (III, II, I, 0). Leur expression est plus importante durant la phase de latence que pendant la phase lytique (Greifenegger et al., 1998).

Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que ces ARN sont localisés essentiellement dans le noyau au sein de complexes ribonucléoprotéiques très stables (Howe and Shu, 1988). Mais ils peuvent aussi être retrouvés dans le cytoplasme au niveau de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Schwemmle et al., 1992). Ces assemblages leur confèrent une structure secondaire en forme de trèfle comparable aux ARN de transfert (**Figure 14**).

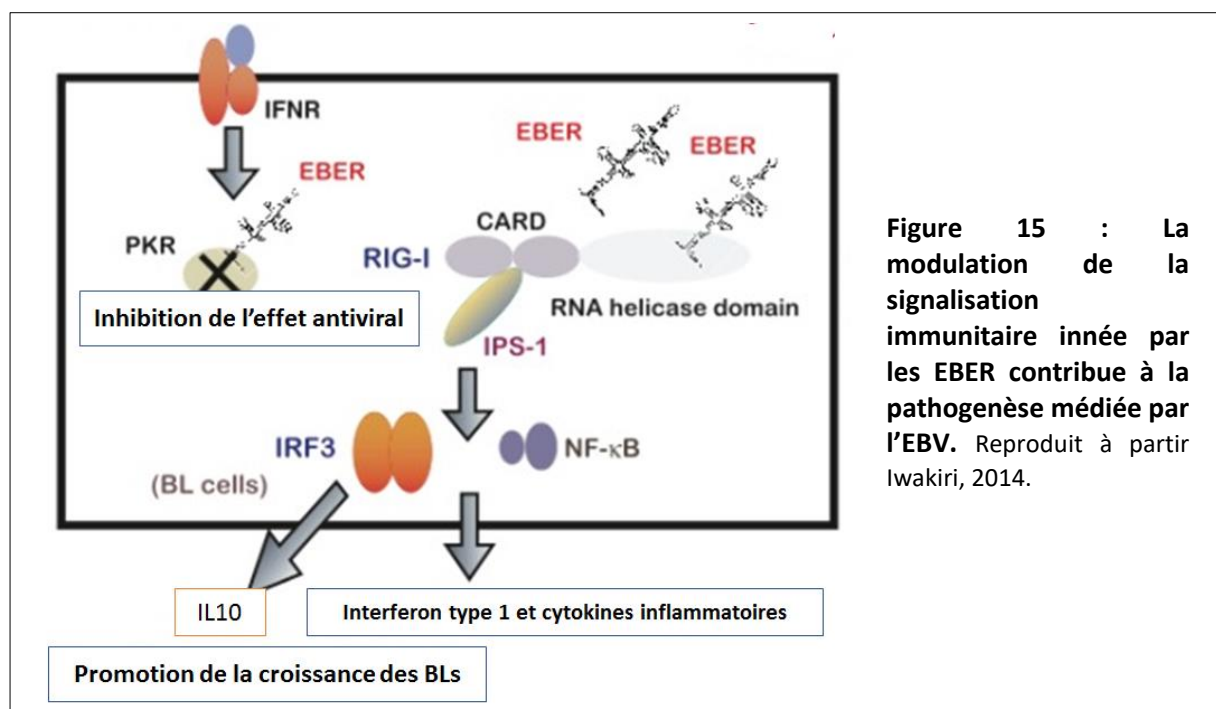


Il a été montré que la protéine EBNA-1 est capable d'augmenter la transcription des ARN EBER en induisant l'expression des facteurs de transcription associés à leur expression (Owen et al., 2010).

Ils agissent comme régulateurs de la signalisation et des facteurs de transcription, ce qui entraîne la production des interférons et des cytokines (Samanta et al., 2008).

Ils induisent l'expression de plusieurs cytokines cellulaires dont l'interleukine-9 dans les cellules T (Yang et al., 2004) et de l'IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) dans les cellules épithéliales (Iwakiri et al., 2003), chacune fonctionnant comme un facteur de croissance autocrine. De plus, ces ARN induisent l'expression de l'IL-10, cytokine immunosuppressive jouant le rôle d'un facteur de croissance autocrine dans les lymphocytes B (Kitagawa et al., 2000), ainsi que celle de la protéine anti-apoptotique Bcl2, ce qui entraîne la malignité et la maintenance de la croissance des cellules dans le lymphome de Burkitt (Komano et al., 1999).

Récemment, Iwakiri et ses collaborateurs ont constaté que les EBER peuvent se lier au RIG-I (gène inducible par l'acide rétinolique I) et activent ainsi sa signalisation en aval. Les EBER peuvent aussi activer la voie du facteur 3 de régulation RIG1/Interféron ce qui conduit à l'induction de l'expression de l'IL-10, suggérant que la modulation de la signalisation immunitaire innée médiée par les EBER contribue à l'oncogenèse EBV-dépendante (Iwakiri, 2014) (**Figure 15**).



En favorisant la surexpression de l'IL-6, qui conduit à l'activation de STAT-3, les EBER diminuent significativement l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire, tels que p27 et p21, conduisant ainsi les cellules à se proliférer (Banerjee et al., 2013).

En outre, les EBER suppriment l'effet antiviral des interférons α et γ (Sharp et al., 1993). En effet, ils confèrent une résistance à l'apoptose induite par l'IFN- α en interagissant avec la PKR (*double stranded RNA-activated Protein Kinase*) et en inhibant sa phosphorylation (Yamamoto et al., 2000; Nanbo et al., 2002).

Récemment, il a été établi que la reconnaissance des EBER par le TLR-3 (*Toll-Like Receptor 3*) conduit à l'induction d'interféron de type I et de cytokines inflammatoires et à une activation immunitaire subséquente. En outre, EBER-1 a été détecté dans les sérums de patients atteints de maladies infectieuses associées à l'EBV, suggérant que l'activation de la signalisation TLR-3 contrôlée par EBER-1 pourrait expliquer la pathogenèse des maladies infectieuses EBV positives (Iwakiri, 2014).

Les EBER induisent aussi une résistance aux agents chimiothérapeutiques anti-cancéreux et favorisent la migration des cellules cancéreuses.

ii. Les ARN BART

Les ARN BART ont été identifiés pour la première fois dans des tissus de carcinome du rhinopharynx (Hitt et al., 1989). Ils sont également retrouvés dans d'autres cancers associés à l'EBV comme certains carcinomes des glandes salivaires (Raab-Traub et al., 1991), certains lymphomes de Hodgkin (Deacon et al., 1993), certains carcinomes gastriques (Sugiura et al., 1996), le lymphome nasal NK/T (Chiang et al., 1996), le lymphome de Burkitt (Tao et al., 1998) et certains carcinomes hépatocellulaires (Sugawara et al., 1999). De plus, les BART ont été détectés dans le sang périphérique d'individus sains positifs pour l'EBV (Chen et al., 1999).

La délétion de la région BART n'affecte pas la capacité du virus à immortaliser des lymphocytes B *in vitro* ce qui indique que les ARN BART ne sont pas essentiels (Robertson et al., 1994). Cependant, des données ultérieures montrent une expression abondante des BART dans les tumeurs EBV positives n'exprimant pas les protéines EBNA qui sont normalement essentielles pour l'oncogénicité du virus, ce qui suggère que les transcrits BART sont importants pour la croissance tumorale (Marquitz and Raab-Traub, 2012).

Les BART forment un groupe d'ARN épissés d'une manière hétérogène ; leur taille varie entre 4 et 8 kpb (Sadler and Raab-Traub, 1995; Smith et al., 2000b). Cet épissage alternatif mène à la production de plusieurs cadres de lecture ouverts pour les protéines et forment des précurseurs pour les microARN.

Les transcrits provenant de cette région BART sont BARF0, BARF1, A73 et RPMS (Karran et al., 1992; Sadler and Raab-Traub, 1995; Smith et al., 2000b). La protéine BARF0, n'est jamais retrouvée *in vivo* du fait de sa durée de vie très courte (van Beek et al., 2003).

Il a été montré que A73 se lie à la protéine RACK1 (*Receptor For Activated C Kinase*) (Smith et al., 2000), connue pour intervenir dans la signalisation des kinases de la famille des Src. Elle peut également réguler la libération de calcium à partir des réserves intracellulaires (Patterson et al., 2004).

La protéine BARF1, retrouvée strictement dans des tumeurs épithéliales (Strockbine et al., 1998), est homologue au récepteur au CSF-1 (*Colony Stimulating Factor 1*). Elle a donc les propriétés oncogènes d'un facteur de croissance surexprimé (Busson et al., 2004).

Quant à la RPMS1, elle joue le rôle d'un antagoniste de l'activité transcriptionnelle induite par Notch-1 et EBNA-2 et cela par compétition de fixation avec la protéine RBP-Jk

(Smith et al., 2000). Une étude récente menée en 2016 a pu montrer un rôle de NF- κ B dans l'activation des promoteurs des BART et ainsi dans la régulation de leur expression dans le carcinome nasopharyngé (Verhoeven et al., 2016).

iii. Les microARN de l'EBV

L'EBV est le premier virus humain à avoir été montré codant pour des microARN (Pfeffer et al., 2004).

Les microARN (miARN) sont des petits ARN simples brins non codants d'environ 19-25 nucléotides de longueur. Ils peuvent se lier à la partie 3'UTR des ARN messagers cibles et inhibent leur expression.

L'EBV possède 49 miARN matures qui résultent de l'épissage de 25 précurseurs de miRNA (pré-miRNA) (Harold et al., 2016; Sakamoto et al., 2017). Ces derniers sont localisés sur deux clusters différents sur le génome viral : la région BART (contient 22 pré-miBART) et la région BHRF1 (contient 3 pré-miBHRF1) (Cai et al., 2006) (**Figure 16**).

Tous les miARN viraux sont transcrits durant la phase de latence, ceux de la région BART sont produits à partir des introns des transcrits BART, à l'exception du miBART-2 qui est transcrit à partir du brin antisens de la région 3'UTR du gène BALF5 (codant pour l'ADN polymérase virale) (Pfeffer et al., 2004).

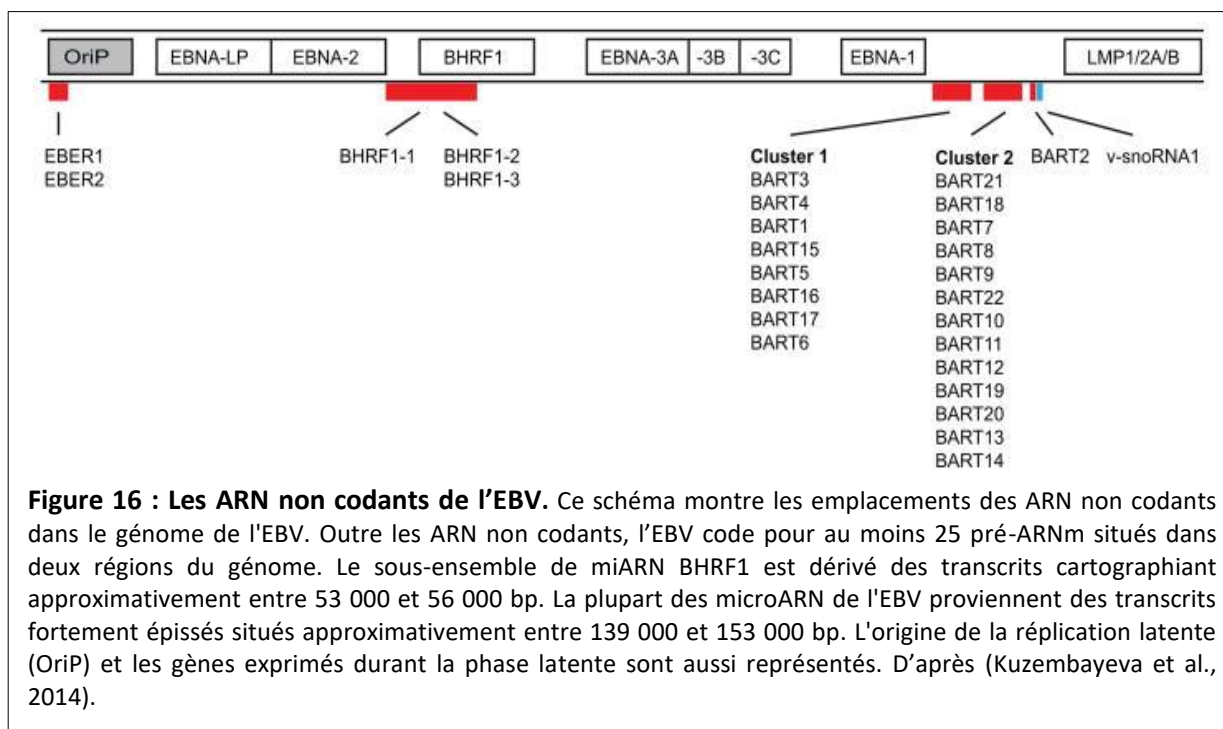
Concernant les miBHRF, ils sont transcrits à partir du gène BHRF1 qui code pour une protéine homologue du Bcl2 (Pfeffer et al., 2004).

Il a été démontré que l'expression des miBART et BHRF1 diffère en fonction de la latence virale et du type cellulaire.

Effectivement, les miBART sont fortement exprimés dans les cellules en latence II comme dans le cas du carcinome du nasopharynx tandis qu'ils sont à peine détectables dans la majorité des BL (latence I) et des LCL (latence III) (Cai et al., 2006). Au contraire, les miBHRF1 ont été identifiés dans la latence III et leur expression est liée à l'utilisation du promoteur Cp/Wp (Forte and Luftig, 2011; Kang and Kieff, 2015).

Les miARN de l'EBV peuvent jouer un rôle important dans l'immortalisation, le maintien de la latence, les processus d'apoptose (activateurs ou inhibiteurs) ainsi que dans l'échappement au système immunitaire et le blocage de la réponse aux interférons (Pfeffer et al., 2004; Lo et al., 2007; Feederle et al., 2011a; Forte and Luftig, 2011; Kuzembayeva et

al., 2014; Marquitz et al., 2015; Albanese et al., 2016) et toutes ces fonctions se font en agissant sur différentes cibles cellulaires et virales.



Parmi les cibles cellulaires des miRNA viraux, notons : PUMA (BART5), Bim (cible de BART9, 11 et 12), BRUCE (BART15-3p), CASP3 (BART1-3p), CLEC2D (BART1-3p), CAPRIN2 (BART13-3p), CXCL11 (BHRF1-3), DICER1 (BART6- 5p), DAZAP2, DICE1, IPO7, PDE7A et PELI1 (BART-3), LY75 et SP100 (BART1-5p), PDCD1LG2 (BHRF1-2-5p, BART1-5p et BART15-3p), T-bet (BART20-5p), TOM22 (BART16), NLRP3 (BART15), ZNF451 (BHRF1-1) (Kuzembayeva et al., 2014).

A titre d'exemple, miBART5 inhibe l'expression de la protéine PUMA (*p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis*), protéine pro-apoptotique induite par p53, ce qui inhibe l'apoptose et favorise la survie cellulaire (Choy et al., 2008).

En ce qui concerne les cibles virales, il a été démontré que les miBART agissent en sous-exprimant les protéines de latence. Elles rendent les cellules infectées par le virus non détectables par le système immunitaire, ce qui renforce la pathogenèse virale ainsi que le maintien de la latence (Cullen, 2011).

Par exemple, le miBART2 peut entraîner la dégradation de l'ARN messager codant pour BALF5 (ADN polymérase de l'EBV), et inhibe ainsi son expression ce qui empêche le passage

du cycle latent au cycle lytique (Barth et al., 2008). Certains miBART comme miBART 1-5p et 17-5p peuvent réguler négativement l'expression de LMP-1 ce qui conduit à la diminution de sa présentation par le CMH de classe I et ainsi diminue le contrôle de la réponse immune anti-LMP-1 (Lo et al. 2007).

De la même façon, le miBART22 peut inhiber l'expression de la protéine LMP-2A permettant aux cellules infectées par l'EBV d'échapper au système immunitaire des cellules infectées par l'EBV (Lung et al., 2009).

Les miBART peuvent aussi renforcer la croissance tumorale associée à l'EBV *in vivo*. Ceci a été démontré en dérégulant leur expression dans des modèles murins. De même, ces miARN sont importants pour le développement des tumeurs préexistantes (Klinke et al., 2014).

Il a été démontré que l'utilisation d'un virus mutant dépourvu des miBHRF1, possède une capacité de transformation des lymphocytes B *in vitro* réduite par comparaison au virus sauvage, ce qui montre le rôle important du cluster BHRF1 dans l'immortalisation (Seto et al., 2010; Feederle et al., 2011a, 2011b). En outre, les miBHRF1 peuvent inhiber l'apoptose durant les phases précoces de l'infection par l'EBV, et favoriser ainsi la progression du cycle cellulaire (Seto et al., 2010).

I.6.3. Infection par l'EBV et persistance virale

Après avoir infecté les cellules B sous-jacentes aux cellules épithéliales de l'oropharynx, le génome de l'EBV se circularise et le virus entre en latence de type III. Les cellules B infectées se développent rapidement dans les zones extrafolliculaires des tissus lymphoïdes oropharyngés tels que les amygdales, et un grand nombre de lymphocytes B infectés peuvent être retrouvés dans le sang (**Figure 17**).

Cette forme de latence correspond à la prolifération des cellules B infectées par l'EBV et favorise l'immortalisation. Chez les individus immunocompétents, ces cellules sont éliminées par les lymphocytes T anti-EBV et les cellules NK parce qu'elles sont hautement immunogènes (résultat de l'expression de l'ensemble des protéines de latence) (Rickinson et al., 2014). Les cellules B infectées restantes contrôlent négativement l'expression de ces protéines immunogènes et passent à un programme de transcription plus limité, le programme par défaut (latence II) et ceci dans le centre germinatif, ce qui leur confère la

pérennité virale. Ensuite, les cellules infectées se situent au niveau du compartiment des cellules B mémoires où le virus peut persister tout au long de la vie de l'hôte avec l'ADN sous forme épisomale. Dans ce cas-là, la protéine EBNA-1 seule est exprimée et il s'agit de latence I. Très rarement sont exprimés les transcrits de la protéine LMP-2A et c'est le programme de latence 0.

Certaines cellules B mémoires (avec le programme de latence 0) circulent entre le sang et les tissus lymphoïdes oropharyngés. La réactivation virale peut survenir lorsque ces cellules pénètrent dans les tissus lymphoïdes de l'oropharynx, provoquant une réplication virale et une exsudation du virus (Thorley-Lawson et al., 2008). Cette réactivation peut entraîner la prolifération de cellules en programme de latence III, contrôlée par la réponse T anti-EBV CD4+ et CD8+. La libération de nouveaux virions peut conduire de nouveaux foyers infectieux qui peuvent être formés au sein de la gorge.

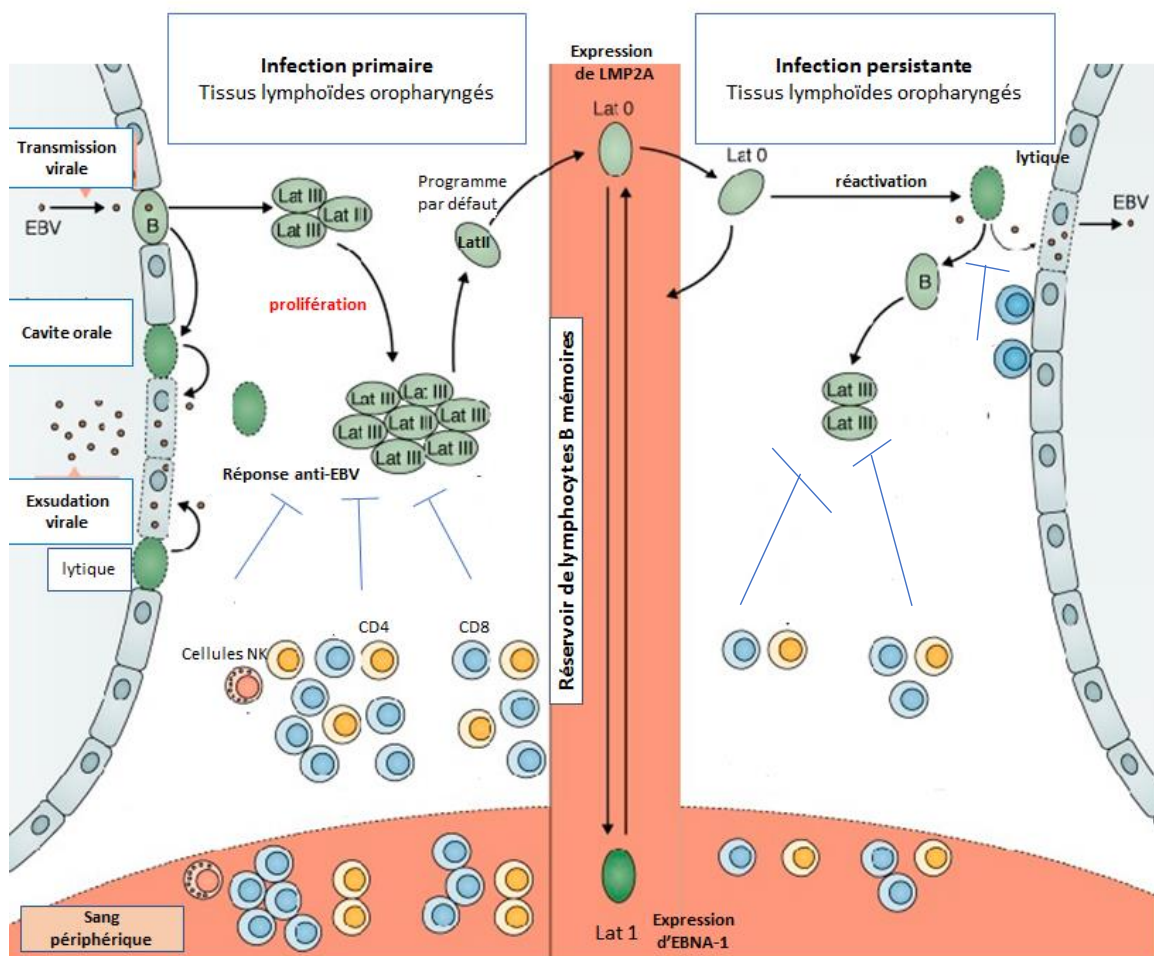


Figure 17 : Infection primaire et persistante par l'EBV chez les personnes immunocompétentes.

Les cellules T sont désignées par CD4 et CD8 ; NK : Natural Killer ; lat0/I/II/III correspondent aux programmes de latence 0/I/II et III. Modifié d'après (Tangye et al., 2017) .

Ce cycle d'infection et l'état de repos dans les cellules B mémoires permettent une latence durant toute la vie de l'hôte, de manière très stable (Thorley-Lawson, 2015).

Chez un immunodéprimé, le contrôle immunitaire, notamment par les lymphocytes T cytotoxiques, ne pourra pas avoir lieu. Ainsi pourra se développer une lymphoprolifération.

Tableau 2 : Cycles lytique et latent de l'EBV.

Cycle de l'EBV	Programme de l'EBV	Fonction	Protéines exprimées	Pathologies associées	Tropisme cellulaire
Lytique	Lytique	-	Protéines lytiques (plus de 80 protéines)	Cancers lymphoïdes	- Cellules épithéliales - Cellules B naïves
Latence	III	Active un lymphocyte B naïf en lymphoblaste prolifératif	Tous les EBNA, LMP-1, LMP-2A, -2B	Lymphomes chez les personnes immunodéprimées	- Cellules B naïves
	II	- Maintien le génome viral - Différenciation d'un lymphoblaste infecté en cellule B mémoire	EBNA-1 LMP-1 LMP-2A	- Lymphomes NK/T - Carcinome nasopharyngé - Lymphome de Hodgkin - Carcinome gastrique	- Cellules B du centre germinatif - Cellules épithéliales
	I	Maintien du génome viral	EBNA1	Lymphome de Burkitt	- Cellules B mémoires - Cellules épithéliales
	0	Permet aux cellules infectées de ne pas être détectées par le système immunitaire	-	-	- Cellules B mémoires
	Atypique	-	EBNA-3A, -3B, -3C EBNA-LP EBNA-1	Lymphome de Burkitt	- Cellules B

Chapitre II

Chapitre II. Pathologies associées à l'EBV

Depuis la découverte de l'EBV dans le lymphome de Burkitt africain en 1964, ce virus a été associé à une gamme remarquablement diversifiée de cancers. Comme l'EBV reste latent dans les lymphocytes B de l'hôte asymptomatique, il est moins difficile d'envisager comment il contribue au développement de lymphomes B. Cependant, l'EBV se retrouve également dans d'autres cancers, y compris les lymphomes des cellules NK/T et plusieurs carcinomes. Le rôle étiologique de l'EBV est difficile à déterminer ; d'une part parce que le virus contribue probablement différemment à chaque tumeur et d'autre part parce que les modèles de maladies disponibles ne peuvent pas récapituler de façon adéquate les variations subtiles de l'équilibre virus-hôte existant entre les différents cancers associés à l'EBV. Un autre défi consiste à identifier les cofacteurs impliqués ; vu que la grande majorité des personnes infectées de façon persistante et/ou latente ne développent jamais de cancer associé à l'EBV, il semble évident que le virus n'est pas seul impliqué.

II.1. Pathologies bénignes

Le **tableau 3** montre les pathologies bénignes causées par l'EBV, survenant chez les personnes immunocompétentes ou immunodéprimées.

Tableau 3 : Pathologies bénignes causées par l'EBV.

Pathologies	Association à l'EBV (%)	Type d'infection	Tissus affectés
Pathologie bénigne chez les sujets immunocompétents			
Mononucléose infectieuse	100	Infection Lytique	Lymphoïde et épithéliale
Pathologie bénigne chez les sujets immunodéprimés			
Leucoplasie chevelue de la langue	100	Infection Lytique	Épithéliale

II.1.1. La mononucléose infectieuse (MNI)

La mononucléose infectieuse est également connue sous le nom de « fièvre glandulaire » ou « la maladie du baiser ». C'est une infection bénigne généralement résolutive. Elle constitue la principale manifestation clinique associée à la primo-infection par l'EBV.

La primo-infection dans la petite enfance est le plus souvent asymptomatique, alors que lorsqu'elle survient chez des adolescents ou des adultes, elle s'accompagne généralement des symptômes de la MNI (Maki and Reich, 1982; Luzuriaga and Sullivan, 2010). Dans les pays émergents et les groupes socio-économiques défavorisés, 80% à 100% des enfants ont des tests sérologiques EBV positifs, lorsqu'ils atteignent l'âge de six ans. Par conséquent, ils ne développent généralement pas de MNI lorsqu'ils sont plus âgés. Dans les pays développés où les conditions économiques et sanitaires sont améliorées, seule la moitié des enfants âgés de 1 à 5 ans ont un test sérologique EBV positif ; d'où un plus grand nombre de personnes présentant une MNI entre 10 et 30 ans (Luzuriaga and Sullivan, 2010).

L'incidence globale de la MNI aux États-Unis a été signalée comme étant d'environ 500 cas par 100 000 personnes par an. Elle est également environ 30 fois plus élevée chez les Blancs que chez les Noirs (Luzuriaga and Sullivan, 2010; Aronson et al., 2014).

La mononucléose infectieuse est considérée comme une maladie aiguë et transitoire, mais la gravité et la durée des symptômes varient considérablement (Papesch and Watkins, 2001).

La durée d'incubation se situe entre 32 et 49 jours selon les individus. La maladie commence par une période prodromique de symptômes tels que les maux de tête, l'anorexie et la fatigue pendant une à deux semaines avant que les symptômes classiques de la maladie se manifestent.

Ces derniers incluent généralement une fièvre, qui n'est pas toujours présente, associée à une angine érythémateuse ou érythémato-pultacée souvent douloureuse. L'examen clinique révèle la présence d'adénopathies, initialement cervicales et d'une hépatosplénomégalie.

Les complications ne sont pas très fréquentes. Il s'agit le plus souvent d'atteintes neurologiques centrales à type d'encéphalite, ou périphériques comme le syndrome de Guillain-Barré (Luzuriaga and Sullivan, 2010), ou de maladies auto-immunes (anémie

hémolytique, thrombopénie, aplasie...). Plus rarement, peuvent survenir une myocardite, une hépatite, des ulcères génitaux et une rupture de la rate.

L'infection par l'EBV peut également provoquer une MNI avec une lymphohistiocytose hémophagocytaire (HLH), ou se présenter sous forme d'une infection EBV active chronique (CAEBV). L'EBV-HLH et le CAEBV sont des complications potentiellement mortelles (Magaki et al., 2017). Les facteurs impliqués dans l'apparition de la MNI avec complications graves incluent l'état immunitaire et des polymorphismes dans HLA (*Human Leukocyte Antigen*)-A1 ou l'interleukine 10 (McAulay et al., 2007; Cohen et al., 2016).

Enfin, notons que les garçons atteints du syndrome de Purtilo, une maladie génétique rare atteignant les garçons porteurs d'un déficit immunitaire sélectif vis-à-vis du virus d'Epstein-Barr, développent des formes très sévères et précoces d'infection à EBV se manifestant par une MNI évoluant rapidement vers une lymphoprolifération mortelle.

Le diagnostic de la MNI est évoqué devant la présentation clinique, la présence de lymphocytes atypiques dans le sang périphérique associée à une cytolyse hépatique et la présence d'anticorps hétérophiles. Le diagnostic est réalisé par la mise en évidence d'anticorps anti-EBV spécifiques.

La MNI se caractérise sur le plan biologique par une hyperleucocytose absolue composée essentiellement de cellules « bleutées » correspondant à des lymphocytes T activés (Macswen et al., 2010). La quantité brute de cellules T CD8+ augmente de 35 à 300 fois dans le cas d'une MNI par rapport à une infection asymptomatique (Hoshino et al., 1999). Une corrélation entre l'intensité de l'activation des lymphocytes T et la gravité des symptômes a été décrite (Williams et al., 2004), ce qui suggère qu'au moins une partie des signes cliniques de la MNI pourrait être la conséquence de l'importante activation des lymphocytes T et de la libération de cytokines associées en particulier à l'IFN- γ et au TNF- α (Foss et al., 1994).

La majorité de ces lymphocytes T CD8+ entrent ensuite en apoptose et ceux qui restent vont constituer la population de cellules mémoires responsables du contrôle du virus lors notamment de l'activation du cycle productif.

Pour la majorité des personnes immunocompétentes, la maladie s'autolimité et la récupération survient après quelques semaines, avec une reprise des activités normales après 2 à 3 mois (Macswen et al., 2010).

II.1.2. Leucoplasie orale chevelue (LOC)

C'est une affection des cellules épithéliales de la muqueuse buccale, associée à l'infection lytique par l'EBV (Greenspan and Greenspan, 1989). Il s'agit très souvent d'une complication de l'infection par le VIH (*Virus de l'Immunodéficience Humaine*). Elle est caractérisée par des excroissances blanchâtres sur la langue (**figure 18**) et survient plus fréquemment chez l'homme (dans les deux tiers des cas), à un âge moyen ou avancé.



Figure 18 : Plaques blanchâtres sur la surface dorsale de la langue

La leucoplasie est couramment reconnue comme un marqueur d'immunodépression sévère. Des études ont montré que dans les couches épithéliales les plus différenciées, se situent les stades les plus avancés de la réplication virale et avec l'expression des gènes viraux lytiques (Walling et al., 2001). Un traitement par ganciclovir ou cidofovir pourrait contribuer à diminuer les lésions, mais ces dernières réapparaissent fréquemment suite à l'arrêt du traitement.

II.2. Pathologies malignes chez les immunocompétents

II.2.1. Le lymphome de Burkitt (BL)

Le lymphome de Burkitt est un lymphome non hodgkinien agressif des cellules B matures, caractérisé par le temps de doublement de la tumeur le plus rapide parmi les tumeurs humaines. Le BL africain est diagnostiqué principalement chez les enfants, plus fréquemment chez les garçons que chez les filles.

Il existe trois formes cliniques et épidémiologiques de BL qui sont décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) : endémique (eBL), sporadique (sBL) et celle liée à l'immunodéficience. L'une des aberrations chromosomiques caractéristique du BL, toutes formes confondues, est la translocation chromosomique juxtaposant le proto-oncogène c-

Myc (chromosome 8) avec les gènes codant pour les chaînes lourdes (chromosome 14) ou légères (chromosome 2 ou 22) des immunoglobulines (**Figure 19**). Il en résulte une expression constitutive de la protéine c-Myc, facteur de transcription associé à la prolifération cellulaire et à la détermination de la transition de phase G1 vers S (Ontiveros et al., 2014).

La forme endémique a été observée en Afrique équatoriale et en Papouasie-Nouvelle-Guinée (Lenze et al., 2011). L'EBV y est trouvé dans plus de 90% des cas. L'incidence de ce lymphome est traditionnellement attribuée à des cofacteurs provoquant la suppression des lymphocytes T, parmi lesquels le paludisme, qui est très répandu dans les régions mentionnées ci-dessus (Musalima et al., 2008). Cette forme se manifeste cliniquement par des tumeurs de la mâchoire et de la cavité abdominale.

La forme sporadique est retrouvée dans le monde entier et notamment dans les pays occidentaux (Etats-Unis et Europe) mais de manière beaucoup plus rare que le BL endémique et est diagnostiquée principalement chez les enfants et les adolescents (où elles représentent 50% de tous les lymphomes pédiatriques). Dans cette forme, l'EBV n'est détectable que dans 15 à 20% des cas. Elle se manifeste généralement par la présence de tumeurs abdominales.

Dans les cas de BL survenant dans un contexte d'immunodépression comme chez les sujets atteints de SIDA, l'EBV est détectable dans 30 à 40% des cas (Gloghini et al., 2013) et se traduit par une atteinte multiviscérale d'emblée.

Les cellules de BL portant l'EBV présentent une latence de type I restreinte à l'expression d'EBNA1, d'EBER et des microARN viraux (Niedobitek et al., 1995; Saha and Robertson, 2011). Toutefois, certains cas de latence de type "Wp restreinte" ainsi que quelques rares cas de latence de type III ont également été observés (Niedobitek et al., 1995; Saha and Robertson, 2011).

Le rôle de l'EBV dans cette pathologie est discuté mais semble certain dans le cas du eBL dans lequel il est associé à d'autres cofacteurs. L'infection chronique par le paludisme serait à l'origine d'une activation polyclonale des lymphocytes B favorisant le développement de réarrangements génétiques critiques. L'infection virale survenant dans ce contexte entraînerait la prolifération de lymphocytes ayant subi une translocation de l'oncogène. Par

ailleurs, l'infection palustre chronique serait à l'origine d'une baisse de l'immunité ne permettant pas le contrôle de cette prolifération.

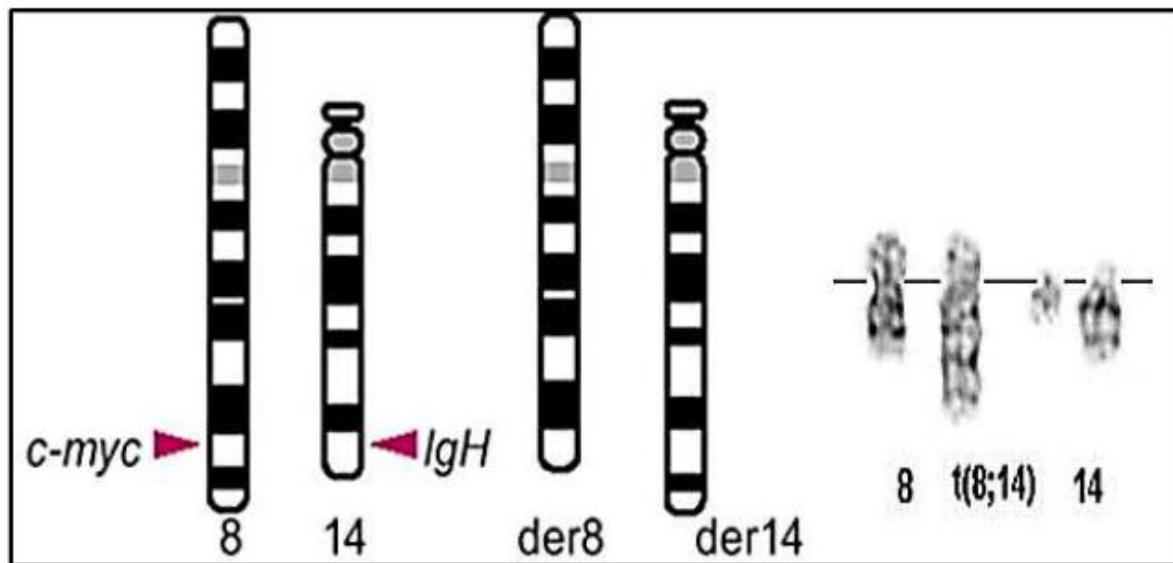


Figure 19 : Schéma représentant la translocation chromosomique du gène *c-Myc* sur le chromosome 14. D'après (Huret et al., 2004).

Une étude menée en 2014, a permis de mieux expliquer les mécanismes moléculaires sous-jacents conduisant à l'apparition du BL. En effet, c'est l'activation du facteur de transcription TCF-3 (*T Cell Factor 3*) de manière constitutive, de différentes façons, qui serait en cause. La première façon se résume à des mutations somatiques du TCF-3, mutations qui inhibent la capacité de son régulateur négatif, ID3, à se lier et à réguler son activité transcriptionnelle. La deuxième façon, concerne des mutations somatiques qui inactivent directement ID3 (Schmitz et al., 2014).

Par ailleurs, la protéine virale EBNA-1 pourrait réguler l'expression de multiples gènes cellulaires impliqués dans la survie des cellules B (Lu et al., 2011; Tempera et al., 2015) et inhiber l'apoptose *via* ses interactions avec des protéines hôtes telles que la protéine anti-apoptotique survivine (Dheekollu et al., 2017) et l'USP7, régulateur de la protéine p53 (Frappier, 2012).

De nombreuses données récentes ont prouvé que les microARN viraux ne sont pas seulement essentiels pour une transformation optimale des cellules B induites par l'EBV

(Klinke et al., 2014), mais jouent également un rôle clé dans le maintien du phénotype des BL (Ambrosio et al., 2014; Vereide et al., 2014; Piccaluga et al., 2015).

Le traitement du lymphome de Burkitt repose principalement sur une polychimiothérapie associée aux corticoïdes. Ceci conduit à une rémission de la maladie dans près de 85% des cas. Par contre, le pronostic vital reste médiocre chez les personnes âgées et dans les cas de rechute (Casulo and Friedberg, 2015).

II.2.2. Le lymphome de Hodgkin (HL)

Le lymphome de Hodgkin (HL) est un lymphome malin caractérisé par la présence de cellules géantes multinucléées de Reed-Sternberg au sein des ganglions (**Figure 20**). Ces dernières sont très minoritaires au sein de la tumeur et sont entourées de cellules inflammatoires réactives.

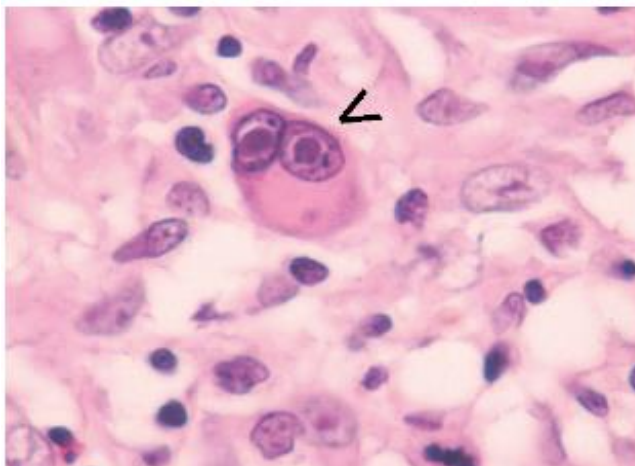


Figure 20 : Cellule de Reed-Sternberg indiquée par une flèche.

Le lymphome HL est divisé en 2 groupes : HL classique (trouvé dans 95 % des cas) et HL nodulaire.

Les liens épidémiologiques entre l'infection par l'EBV et le HL ont été observés depuis la découverte de ce virus en 1964, mais la présence de ce pathogène dans les cellules de Hodgkin/Reed-Sternberg (HRS) a été documentée par Weiss et ses collaborateurs dans les années 1980 (Weiss et al., 1987). Le virus y établit une latence de type II avec expression des protéines EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B (Levine et al., 1994). L'expression des EBER a été confirmée par hybridation *in situ* (Takeuchi et al., 1997).

Les cellules HRS portant l'EBV se trouvent le plus souvent chez les patients de moins de 10 ans (40%-85% des cas) ainsi que chez les patients de plus de 75 ans (45% - 80%) (Glaser et al., 1997). L'apparition fréquente de ce virus dans les HL chez les enfants et les personnes âgées peut résulter respectivement d'un système immunitaire moins développé et sénéscent. Lorsque le lymphome HL survient chez des patients atteints de SIDA, l'association avec l'EBV est quasi-constante (Farrell and Jarrett, 2011).

Les différents sous-types de HL classique portent l'EBV à des degrés variables : le virus n'est quasiment jamais trouvé dans le sous-type à prédominance lymphocytaire, présent dans 10 à 40% des cas de sous-type scléronodulaire, qui est le plus fréquent, trouvé dans environ 70% des sous-types à cellularité mixte (Zhang et al., 2014) où l'infection par l'EBV est étroitement liée au pronostic et dans > 95% des cas avec déplétion lymphocytaire.

Il est intéressant de noter que l'incidence de l'EBV dans le HL diffère aussi géographiquement, avec une incidence de 30-50% dans les pays développés et près de 100% chez les enfants des pays émergents.

Le BCR et le CD40 sont deux signaux de survie majeurs pour les lymphocytes B du centre germinatif (CG). Il a été démontré qu'après auto-agrégation et oligomérisation, LMP-2A mime le BCR et LMP-1 imite le récepteur actif CD40. Ces ressemblances créent ainsi un signal de croissance cellulaire comparable au signal cellulaire qui normalement résulte de la liaison du ligand CD40. L'hypothèse principale réside dans le fait que l'EBV pourrait faciliter la survie des cellules du CG (Küppers, 2009) suite à l'activation des voies classiques et alternatives de NF- κ B et aussi reprogrammer les cellules B/EBV+ pour leur donner le phénotype des cellules HRS (Vockerodt et al., 2008). La protéine virale BCRF1 montre aussi une homologie avec l'IL-10 humaine qui entraîne une immunosuppression. Une relation entre la présence de certains polymorphismes dans la région HLA de classe I et l'incidence du HL/EBV positif a été documentée (Niens et al., 2007).

Il est à noter que, les patients ayant eu une MNI très symptomatique présentent un risque plus important de développer un HL associé à l'EBV (Hjalgrim et al., 2007). De même, une charge virale élevée au cours de la MNI est liée à un risque élevé de développer le lymphome HL au cours de la vie (Mueller et al., 2012).

La thérapie pour les lymphomes de Hodgkin EBV+ et EBV- est identique et entraîne des rémissions à long terme chez la plupart des patients. Cependant, les patients HL/EBV+ en rechute ont un mauvais pronostic (Zhang et al., 2014). Parmi les thérapies récentes, on cite celles qui tentent de bloquer les points de contrôle immunologique en ciblant les protéines associées à l'axe PD1/PD-L1 (*Programmed cell Death 1/Programmed cell Death-Ligand 1*) et aux cellules T cytotoxiques CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4*). Cette technique a donné des résultats encourageants pour le HL ainsi que pour d'autres types de lymphomes (Galanina et al., 2017).

II.2.3. Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)

Selon la classification de 2016 de l'OMS, les DLBCL constituent un grand groupe hétérogène de néoplasies hématologiques (Swerdlow et al., 2016). Ce sont les néoplasies les plus répandues dans le monde entier représentant jusqu'à 30 à 40% de tous les lymphomes non hodgkiniens. L'EBV est très fréquemment trouvé dans les formes associées à une déficience immunitaire, alors que dans les DLBCL des sujets immunocompétents, il est trouvé seulement dans environ 10% des cas (Roschewski and Wilson, 2012). La prolifération clonale concerne soit des lymphocytes B du centre germinatif pour la forme GCB-DLBCL (à cellules B du centre germinatif), soit des lymphocytes B de la zone marginale pour la forme ABC-DLBCL (avec cellules B activées). Des variantes et des sous-types sont décrits.

Les formes décrites ci-dessous sont associées à une infection par l'EBV.

II.2.3.a. DLBCL/EBV+ des sujets âgés

Cette néoplasie est classée dans le groupe des DLBCL non spécifiés (NOS). Elle se développe généralement chez les personnes âgées de plus de 50 ans et qui ne présentent pas d'immunodéficience flagrante (Castillo et al., 2016, revue). C'est le DLBCL le plus associé à l'EBV (100% des cas).

Le DLBCL/EBV+ des sujets âgés compte pour 8 à 10% des DLBCL diagnostiqués chez les patients asiatiques. En revanche, la maladie semble beaucoup plus rare (<5%) dans les populations occidentales, ce qui souligne son origine ethnique ou géographique potentielle (Oyama et al., 2007). Le pronostic d'un DLBCL/EBV+ est moins favorable que celui d'un DLBCL/EBV-.

Normalement, la malignité est présente dans les sites extra-ganglionnaires, sous la forme d'un infiltrat de cellules géantes et polymorphes ressemblant à des cellules HRS, ce qui peut conduire à une erreur de diagnostic entre un DLBCL/EBV+ et un HL/EBV+. Ces cellules expriment les EBER et la protéine LMP-1 (Oyama et al., 2007). L'expression accrue de LMP-1 pourrait expliquer en partie l'agressivité de ces lymphomes. Dans la plupart des cas d'ABC-DLBCL, une activation de NF- κ B est prépondérante, ce qui est associé à une maladie plus agressive et de mauvais pronostic.

Vu que les personnes âgées atteintes de DLBCL/EBV+ supportent difficilement les chimiothérapies agressives, les perspectives thérapeutiques sont dirigées vers l'immunothérapie adaptative qui cible les antigènes de latence de l'EBV (Park et al., 2007).

II.2.3.b. DLBCL associé à une inflammation chronique (DLBCL-CI)

Le DLBCL-CI est un lymphome agressif, conséquence d'une inflammation chronique persistante (>10 ans), mais pouvant survenir aussi dans un contexte d'immunosuppression systémique. La grande majorité des cas (70%) est associée à une infection par l'EBV. Le prototype du DLBCL-CI est le lymphome associé au pyothorax (PAL), qui correspond au développement de tumeurs dans la cavité thoracique. Cette tumeur, très rare, décrite à l'origine au Japon, est également diagnostiquée chez des patients d'autres pays, mais encore plus rarement (Aozasa et al., 2005). Elle survient très majoritairement chez les hommes.

Le DLBCL-CI est principalement extraganglionnaire et dans le cas du PAL implique la cavité pleurale. Ce lymphome se développe après 20 à 40 ans de pyothorax ou de pleurésie tuberculeuse. D'autres localisations de lymphomes incluent les os, des cavités articulaires ou des tissus conjonctifs périarticulaires chez des patients ayant des antécédents d'ostéomyélite ou portant des implants métalliques. L'EBV exprime généralement un programme de latence III. Les cellules B/EBV+ du DLBCL-CI sont capables d'échapper au système immunitaire et de proliférer suite à différents mécanismes tels que la croissance autocrine *via* l'interleukine 6.

En outre, les cellules de ce lymphome présentent un certain nombre d'anomalies cytogénétiques. Le taux de survie à 5 ans des patients atteints de PAL est d'environ 20 à 35% (Boroumand et al., 2012).

II.2.4. La granulomatose lymphomatoïde

La granulomatose lymphomatoïde est une maladie lymphoproliférative rare survenant dans un contexte inflammatoire. Elle est caractérisée par la présence de cellules B transformées par l'EBV dans 100% des cas (Jaffe and Wilson, 1997). L'EBV y exprime un programme de latence II. Son évolution est très variable, mais le pronostic est globalement défavorable à court terme, la médiane de survie étant de 4 ans.

Cette pathologie peut être divisée en trois grades en fonction de la proportion des cellules B EBV positives présentes et du processus de nécrose. Les patients présentant les grades I et II peuvent avoir des rémissions spontanées sans traitement. Concernant ceux qui sont atteints de la forme agressive (grade III), ils peuvent décéder du fait de l'atteinte pulmonaire (complication de la granulomatose). La chimiothérapie EPOCH (Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide et Doxorubicine) peut être utilisée comme traitement (Tagliavini et al., 2013).

II.2.5. Le lymphome NK/T extraganglionnaire de type nasal (NK/TL)

Il s'agit d'un lymphome rare avec une étiopathogénie associée à l'infection par l'EBV. Son incidence varie en fonction de la région géographique ; il est relativement répandu chez les patients d'Asie, du Mexique et d'Amérique du Sud, régions dans lesquelles il représente 7 à 10% des LNH. Il est plus rare en Occident où il représente seulement 1% des LNH (Au et al., 2009). Les hommes sont plus souvent affectés que les femmes, avec un ratio homme/femme 2-3/1, et l'âge moyen au moment du diagnostic est de 50 ans (Chim et al., 2005).

La néoplasie se développe à la suite d'une transformation maligne de cellules NK/T qui expriment les CD2, CD56 et TIA-1 (*T-cell Intracellular Antigen 1*) et ne nécessitent pas le réarrangement du gène du récepteur de l'antigène lymphocytaire T, CD3 (Zhang et al., 2014).

Ces lymphoproliférations monoclonales sont associées à l'infection par l'EBV dans 100% des cas et ont un profil de latence de l'EBV de type II (Kanegane et al., 1998). Les cellules du lymphome expriment EBER (Li et al., 2014).

L'activation constitutive de NF- κ B et de ses voies en aval, entraînée par la protéine virale LMP-1, a été proposée comme pivot de la pathogenèse et de la progression de la maladie des cellules NK/T.

La maladie peut se produire dans n'importe quels sites extra-ganglionnaires, imitant fréquemment un processus inflammatoire ; les voies respiratoires supérieures, en particulier la cavité nasale, sont parmi les organes les plus fréquemment atteints (Suzuki, 2014), mais la maladie peut aussi toucher la peau, la cavité orbitale, le tube digestif, les reins ou les testicules (Au et al., 2009).

Le lymphome NK/T se caractérise par un processus inflammatoire, prolifératif, progressif et destructif, une forte agressivité et un processus de croissance angiocentrique (Li et al., 2014).

La charge virale sanguine est en relation avec l'importance de la masse tumorale et l'agressivité de la maladie.

Selon la thérapie appliquée, les taux de survie à 5 ans varient entre 40% et 65% ; la chimio-radiothérapie présente les résultats de traitement les plus satisfaisants (Kwong, 2005).

II.2.6. Leucémie agressive à cellules NK (ANKL)

Cette pathologie, très rare, est presque toujours associée à une infection par l'EBV. Il peut s'agir de l'évolution d'un NK/TL. Sa manifestation clinique est dominée par la présence de symptômes B (fièvre inexpliquée, sueurs nocturnes importantes et perte de poids inexpliquée), d'hépatomégalie importante avec dysfonctionnement hépatique et de splénomégalie (Suzuki, 2014). L'âge médian au moment du diagnostic est de 42 ans ; cette pathologie est légèrement plus fréquente chez les hommes que chez les femmes (Kwong, 2005).

La plupart des patients présentent une anémie et une thrombocytopénie. Le nombre de cellules NK dans le sang périphérique dépasse généralement 10 000/mL (Grywalska and Rolinski, 2015). Les cellules néoplasiques sont également présentes dans la moelle osseuse. La maladie présente un phénotype clinique très agressif : la plupart des patients meurent dans les 2 mois suivant le diagnostic.

Le phénotype des cellules leucémiques agressives est caractérisé par la présence de CD2, CD56, et parfois aussi d'antigène CD16 ; il ne possède pas la molécule CD3.

La chimiothérapie est le traitement principal de cette pathologie.

II.2.7. Carcinome du nasopharynx (NPC)

Le NPC est un cancer des cellules épithéliales qui tapissent la cavité nasopharyngée en arrière des fosses nasales : il présente des caractéristiques hautement invasives et métastatiques. Il est caractérisé par la présence de cellules carcinomateuses indifférenciées et d'un infiltrat lymphocytaire très abondant.

Les taux d'incidence et de mortalité des NPC sont remarquablement élevés dans le sud de la Chine et l'Asie du Sud-Est. Dans ces zones endémiques, l'incidence annuelle du NPC atteint 20-30 par 100 000 habitants (Xie et al., 2016). Les principaux facteurs de risque incluent l'infection par l'EBV, les agents cancérogènes environnementaux et certaines origines ethniques (Edreis et al., 2016) . Par ailleurs, le NPC est rarement observé dans les pays occidentaux et l'incidence est inférieure à 1 cas pour 100 000 personnes (Lo et al., 2004).

Raab-Traub a confirmé la monoclonalité virale dans les NPC, ce qui indique la présence de l'EBV, avant l'expansion du clone malin (Raab-Traub, 2002).

Selon la dernière classification de l'OMS, le NPC est classé en deux principaux sous-types histologiques : le carcinome non kératinisant (non différencié ou indifférencié) et le carcinome épidermoïde kératinisant. Le NPC non kératinisant est constamment associé à une infection par l'EBV et représente la majorité des NPC dans les régions endémiques. Il est couramment décrit comme un lympho-épithéliome du nasopharynx en raison de son infiltration lymphocytaire proéminente. Une infection EBV latente est également observée chez les NPC kératinisant des régions endémiques, mais pas dans les régions non endémiques.

En résumé, plus de 98% de tous les NPC sont associés à l'EBV (Tsao et al., 2015). L'EBV présente une latence de type II et les cellules infectées expriment les protéines de latence EBNA-1, LMP-1 et LMP-2. Les protéines LMP jouent un rôle important dans l'émergence du NPC (Dawson et al., 2012).

L'expression de la protéine LMP-1, oncogène majeur de l'EBV, aide à la transformation des cellules épithéliales infectées (Hildesheim and Wang, 2012). En outre, le virus aide les cellules transformées à échapper aux réponses immunitaires de l'hôte (Ressing et al., 2015; Shen et al., 2015).

Les NPC sont traités par la radiothérapie dans la plupart des cas, avec un taux de survie de 84 à 90 % en fonction de l'avancement de la maladie (Lee et al., 2009).

Tout comme dans le cas du NK/TL, la quantification du génome viral dans le sang des patients est un outil de suivi de l'efficacité du traitement : une charge virale faible est observée dans le cas de patients en rémission ; à l'inverse une charge virale élevée est un facteur de mauvais pronostic souvent précurseur d'une rechute (Lo, 2001).

II.2.8. Carcinome gastrique

L'EBV est détecté dans environ 10% des cas de carcinome gastrique à travers le monde. Il est présent dans les adénocarcinomes conventionnels et les lympho-épithéliomes gastriques (LELC) (Shibata et al., 1991; Shibata and Weiss, 1992).

Le carcinome gastrique associé à l'EBV (EBVaGC) présente des caractéristiques clinico-pathologiques distinctes. Il est défini comme un carcinome faiblement différencié avec une infiltration lymphocytaire dense principalement chez les hommes et chez les jeunes, et présente un type histologique généralement diffus.

Au niveau de la tumeur, l'EBV est présent de manière monoclonale dans l'ensemble des cellules tumorales. L'expression sélective des gènes de l'EBV (latence de type II) est censée contribuer à la transformation maligne des cellules épithéliales en perturbant divers processus cellulaires et des voies de signalisation. En effet, l'expression de ces gènes conduit à l'inhibition du gène *PTEN* (*Phosphatase and Tensin homolog*), un suppresseur de tumeur, à l'inhibition de l'apoptose et à une augmentation de la prolifération cellulaire (Nishikawa et al., 2014).

La signature distincte des mutations et le modèle de méthylation identifiés dans les EBVaGC, confirment que l'infection par l'EBV facilite le processus de la tumorigenèse dans les tumeurs épithéliales malignes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014; Wang et al., 2014). On cite à titre d'exemple les mutations du gène *PIK3CA* (*Phosphatidylinositol-4,5-*

biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha) impliqué normalement dans la régulation de la prolifération cellulaire, l'hyperméthylation de l'ADN et la surexpression de PD-L1 et PD-L2.

La forte association entre l'EBV et les LELC suggère que les propriétés peu différenciées des cellules épithéliales et l'environnement inflammatoire sont impliqués dans l'oncogenèse virale (Rickinson, 2014), ce qui peut également être vrai pour les lymphomes associés à l'EBV (Vockerodt et al., 2015).

Actuellement, la chirurgie est le seul moyen thérapeutique pour les EBVaGC.

Les pathologies associées à l'EBV chez les sujets immunocompétents, détaillées dans ce chapitre, sont récapitulées dans le tableau ci-dessous (**tableau 4**).

Tableau 4 : Pathologies malignes associées à l'EBV chez les sujets immunocompétents.

Pathologies	Sous-type	Association à l'EBV (%)	Type d'infection	Tissus affectés
Lymphome de Burkitt	Endémique	>90	Latence I	Lymphoïde
	Sporadique	15-20	Latence I	Lymphoïde
Lymphome de Hodgkin classique	Déplétion lymphocytaire	>95	Latence II	Lymphoïde
	Cellularité mixte	70-80	Latence II	Lymphoïde
	Scléronodulaire	10-40	Latence II	Lymphoïde
	Prédominance lymphocytaire	≈ 5	Latence II	Lymphoïde
Lymphoproliférations NK/T	CAEBV	100	Latence II	Lymphoïde
	Nasal	100	Latence II	Lymphoïde
	Agressive	100	Latence II	Lymphoïde
DLBCL	Associé à une inflammation chronique (PAL)	≈ 70%	Latence III	Lymphoïde

	EBV-positif chez les personnes âgées	100	Latence II/III	Lymphoïde
Granulomatose lymphomatoïde	-	100	Latence II	Lymphoïde
Carcinome du Nasopharynx	-	>95	Latence II	Épithéliale
Carcinome gastrique	-	≈10	Latence II	Épithéliale

II.3. Pathologies survenant chez l'immunodéprimé

Les cellules T jouent un rôle essentiel dans la réponse immunitaire qui contrôle la transformation par l'EBV.

Une immunosuppression T héréditaire ou acquise, un dysfonctionnement des cellules T, ou une immunosuppression thérapeutique peuvent alors conduire à la survenue de maladies lymphoprolifératives liées à l'EBV.

II.3.1. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT)

L'immunodépression thérapeutique des transplantés, que ce soit une transplantation d'organes solides (SOT) ou de cellules souches hématopoïétiques (HSCT), favorise le développement de lymphoproliférations ; on parle alors de SLPT (syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation). L'EBV est décrit comme un agent causal pour ces lymphoproliférations. Les tumeurs EBV-positives se produisent plutôt après les allogreffes (3-6 mois pour HSCT, 12-24 mois pour SOT) (Evens et al., 2010 ; Styczynski et al., 2009).

Les SLPT se caractérisent par un large spectre morphologique et montrent des caractéristiques histopathologiques variables. Ils peuvent être physiologiquement subdivisés en monomorphes, polymorphes, plasmocytaires ou comme variants du lymphome de Hodgkin (Draoua et al., 2004).

Les SLPT sont majoritairement de phénotype B, mais ils peuvent aussi provenir des cellules T ou NK (Draoua et al., 2004) .

Les cellules issues de SLPT B expriment majoritairement une latence de type III mais les latences de type I et II peuvent aussi être détectées (Young and Murray, 2003; Young and Rickinson, 2004).

Les SLPT ne se développent pas dans les ganglions mais sont multifocaux et concernent généralement l'organe transplanté ou le tractus gastro-intestinal. L'incidence de survenue est en rapport avec l'immunosuppression et varie avec le type d'organe greffé.

Une relation entre la charge virale de l'EBV et le risque de développer le SLPT chez les patients a été mise en évidence, ce qui rend important de quantifier régulièrement le génome viral dans le sang périphérique des patients pour prévenir ces maladies (Dharnidharka, 2017).

Les lymphomes SLPT peuvent régresser suite à plusieurs stratégies : la levée de l'immunosuppression par rétablissement d'une réponse immunitaire efficace, l'utilisation d'anticorps monoclonaux anti-CD20 (rituximab), la radiothérapie et la chimiothérapie. Des résultats controversés et peu concluants ont été obtenus suite à l'utilisation de traitements antiviraux (Gottschalk et al., 2005). L'efficacité limitée de ces traitements peut être la conséquence du fait que l'EBV est présent sous la forme latente dans les cellules de SLPT.

Parmi les stratégies nouvellement envisagées chez les patients développant une lymphoprolifération associée à l'EBV, il en existe une qui consiste à induire le cycle lytique du virus pour utiliser ultérieurement un antiviral comme l'aciclovir ou le ganciclovir.

II.3.2. Lymphomes associés à l'EBV chez le malade du SIDA

Les patients atteints de SIDA ou porteurs du VIH sont sujets à développer des lymphomes comme le HL, le BL, le DLBCL et le PCNSL (*Primary Central Nervous System Lymphoma*), correspondant à un sous-type de DLBCL beaucoup plus fréquent chez les patients positifs pour le VIH. Parmi ces lymphomes, 60 à 90% sont associés à l'EBV. En effet, l'EBV induit une protection contre l'apoptose et favorise la survie cellulaire. Ces particularités propres à l'EBV, conjointement à la suppression de la réponse immunitaire, favorisent le développement de lymphomes (Carbone et al., 2009).

II.3.3. Lymphomes primitifs des séreuses (PEL, *Primary Effusion Lymphoma*)

Le PEL est un DLBCL qui intervient généralement dans un contexte d'immunodépression et dans la plupart des cas chez des sujets infectés par le VIH (Fassone et al., 2000). Il provient de la transformation maligne d'une cellule lymphoïde B par l'HHV-8, autre γ -herpèsvirus

associé à la survenue de cancers, essentiellement chez l'immunodéprimé. En outre, l'EBV est trouvé dans les cellules cancéreuses dans de nombreux cas.

L'atteinte des cavités séreuses corporelles (cavité pleurale, péricardique ou péritonéale) sans masse tumorale détectable et sans lymphadénopathie est la caractéristique clinique du PEL. La présence d'EBER est détectée dans 70% des cas associés à l'EBV (Fan et al., 2005). De plus, il y a expression de la protéine EBNA-1 d'où l'attribution d'une latence de type I. Le pronostic est très faible, avec une survie médiane de 6 mois (El-Fattah, 2016). Il n'existe pas encore de traitement efficace pour les PEL.

II.3.4. Lymphomes plasmablastiques (PBL)

Il s'agit d'un lymphome rare très agressif, décrit à l'origine chez des personnes infectées par le VIH ou beaucoup plus rarement chez des personnes âgées (Delecluse et al., 1997). Cette tumeur siège principalement au niveau de la cavité orale. Environ 60% des cas se révèlent associés à une infection par l'EBV (Cesarman, 2013). L'expression du génome est le plus souvent limitée aux EBER. Le rôle de l'EBV dans cette pathologie reste actuellement incompris. Le PBL peut également affecter les personnes immunodéprimées après transplantation d'organe lorsque le nombre de CD4 est extrêmement faible (Borenstein et al., 2007).

Des réarrangements *c-myc* ont été montrés dans environ 50% des cas et plus précisément chez les patients atteints de PBL/EBV+, ce qui pourrait laisser envisager un mécanisme de lymphomagenèse associée à l'EBV (Valera et al., 2010). Comme les PEL, ils sont diagnostiqués tardivement, ce qui mène à un mauvais pronostic de survie (Tchernonog et al., 2017).

II.3.5. Léiomyosarcomes liés à l'immunodéficience

Le déficit immunitaire lié à une infection par le VIH ou à un traitement immunosuppresseur chez l'enfant transplanté, peut favoriser la survenue d'un léiomyosarcome. Il s'agit d'une néoplasie rare des cellules musculaires lisses qui pourrait être associée à l'EBV (McClain et al., 1995). Rogatsch et ses collaborateurs ont montré que les cellules tumorales peuvent exprimer le CD21, récepteur de l'EBV, d'une façon variable, et que l'EBV y exprime un programme de latence de type III (Rogatsch et al., 2000).

Aucune infection des cellules musculaires lisses normales adjacentes à la tumeur EBV+ n'a été vue et l'EBV n'a pas été trouvé associé aux léiomyosarcomes de patients immunocompétents. Ce qui suggère que l'infection de ces cellules par l'EBV ne se fait que dans les cas d'immunosuppression, augmentant ainsi le risque d'une transformation maligne. Le traitement repose sur la chirurgie, et parfois sur la radiothérapie locale associée à une chimiothérapie. Le pronostic dépend de l'extension tumorale au moment du diagnostic et de la qualité de l'ablation.

Le tableau 5 représente quelques pathologies malignes associées à l'EBV chez les sujets immunodéprimés.

Tableau 5 : Pathologies malignes associées à l'EBV chez les sujets immunodéprimés.

Pathologies	Sous-type	Association à l'EBV	Type d'infection	Tissus affectés
Lymphome de Burkitt	BL associé au SIDA	30-40	Latence I	Lymphoïde
Lymphome primitif des séreuses	-	75-90	Latence I	Lymphoïde
Lymphome plasmablastique (SIDA)	-	75-90	Latence I	Lymphoïde
Lymphome de Hodgkin	HL associé au SIDA	>90	Latence II	Lymphoïde
DLBCL	DLBCL associé au SIDA	20-60	Latence I/II/III	Lymphoïde
Désordre lymphoprolifératif post-transplantation	Des cellules B	>95	Latence III	Lymphoïde
Léiomyosarcome	-	Fréquent	Latence III	Cellules musculaires lisses

Chapitre III

Chapitre III. Physiologie et différenciation des cellules T : les cellules T_{FH}

III.1. Introduction

Les lymphocytes T (LT) représentent plus de 80% des lymphocytes circulants dans le sang. Ils sont produits au niveau du thymus à partir d'un progéniteur lymphoïde provenant de la moelle osseuse. Ce progéniteur, quant à lui, est issu de la différenciation des cellules souches hématopoïétiques.

Les LT sont des cellules de l'immunité adaptative. Ils interviennent dans les réponses à médiation cellulaire et peuvent également contrôler l'immunité à médiation humorale. Les LT reconnaissent les agents pathogènes de manière spécifique grâce à leur récepteur pour l'antigène : le TCR (*T Cell Receptor*).

Ils sont divisés en 2 catégories en fonction des chaînes qui constituent leur TCR : les lymphocytes T $\alpha\beta$ qui sont majoritairement représentés et les lymphocytes T $\gamma\delta$ qui représentent 1 à 10 % des lymphocytes T totaux chez l'homme.

III.2. Le thymus : organogenèse et structure

Le thymus dérive de la troisième poche pharyngée de l'endoderme. Il est fonctionnel dès la sixième semaine de vie embryonnaire.

Il s'agit d'un organe médian, bilobé, thoracique ou le plus souvent cervico-thoracique, situé dans le médiastin antérieur.

Sur le plan histologique, chaque lobe thymique est organisé en unités fonctionnelles, les lobules séparés entre eux par des invaginations de la capsule appelées trabécules.

Au sein de ces lobules, on distingue une zone externe, le cortex, et une zone plus centrale, la médullaire.

Ces différentes régions sont composées, en plus des thymocytes à leur différent stade de développement (*cf* plus loin), des cellules épithéliales et des fibroblastes. Cependant, des macrophages et des cellules dendritiques sont également présents dans la médullaire.

III.3. Le développement lymphocytaire

Les progéniteurs lymphoïdes communs provenant de la moelle osseuse pénètrent dans le thymus par des veinules post capillaires situées au niveau de la jonction cortico-médullaire

(Lind et al., 2001; Scimone et al., 2006). L'expression des récepteurs aux chimiokines CCR7 et CCR9 par ces progéniteurs a notamment été identifiée comme essentielle pour leur accès au thymus (Scimone et al., 2006).

Le passage dans le thymus leur permet de se développer pour donner naissance à des lymphocytes T matures dit « naïfs ». La production journalière est estimée à environ 10^8 lymphocytes par jour.

Lors de ce développement, les lymphocytes immatures appelés thymocytes subissent un certain nombre de modifications phénotypiques. En outre, les gènes codant pour les chaînes du TCR se réarrangent, aboutissant à la formation d'un pré-TCR puis d'un TCR mature qui permettent aux thymocytes d'interagir avec les autres cellules du thymus (cellules épithéliales et cellules dendritiques). Le but final est de produire des lymphocytes T susceptibles de reconnaître des antigènes extérieurs et ne pas réagir avec des antigènes du soi.

Les principaux stades de développement des thymocytes sont les suivants :

- **Thymocytes Double Négatifs ou DN (CD4-/CD8-)** : ces thymocytes expriment les protéines de la machinerie moléculaire nécessaires au réarrangement des gènes codant le TCR, telles que les enzymes de recombinaison RAG1 et RAG2 (*Recombinaison Activating Genes 1 et 2*) (Mombaerts et al., 1992; Shinkai et al., 1992). Ces enzymes sont capables de cliver puis de réparer l'ADN. Ceci explique que le déficit congénital en enzymes RAG soit responsable d'un déficit immunitaire touchant les populations lymphocytaires T et B.

D'autre part et en se basant sur l'expression des marqueurs CD25 et CD44, 4 stades distincts de différenciation des thymocytes double-négatifs ont été décrits : double-négatifs 1 à 4 (DN1 à DN4) (Godfrey et al., 2012). Jusqu'au stade DN3, le développement des thymocytes est induit par Notch1 et supporté par l'IL-7 sécrétée par les cellules stromales corticales (Peschon et al., 1994; Radtke et al., 1999). Au stade DN2-DN3, les thymocytes vont tout d'abord réarranger les gènes V, D et J codant pour la chaîne β du TCR (von Boehmer, 2005; Saint-Ruf et al., 2009). Si le processus de recombinaison génique est productif, la chaîne β sera exprimée à la membrane du thymocyte et stabilisée par la co-expression d'une chaîne α de substitution, la chaîne pré-T α . Ensemble, la chaîne β et la chaîne pré-T α formeront le pré-TCR. L'initiation de la transduction du signal par le pré-TCR permet l'exclusion allélique du locus non réarrangé et le passage au stade DN4. Ce dernier est

associé à la perte d'expression du marqueur CD25, puis à une prolifération cellulaire intense aboutissant au stade double-positif CD4+ CD8+.

- **Thymocytes Double positifs ou DP** (CD4+/CD8+) : ils représentent 80 à 90 % des thymocytes présents dans le thymus (Sebzda et al., 1999) et sont marqués par l'expression en surface du TCR $\alpha\beta$ après recombinaison fonctionnelle des gènes V et J de la chaîne α (Alam et al., 1996).

a) Sélection positive : les thymocytes double-positifs vont ensuite subir la sélection positive au niveau du cortex thymique (Benoist and Mathis, 1989). Celle-ci va permettre de ne garder que les thymocytes T qui ont un TCR capable de reconnaître des peptides présentés sur les molécules de CMH (I et II) du soi par les cellules épithéliales thymiques corticales. 90% des thymocytes double-positifs n'auront pas une affinité suffisante pour les complexes CMH-peptide et seront éliminés puisqu'incapables de recevoir les signaux de survie transmis lors d'une interaction de bonne affinité (Bousso et al., 2002). On parle dans cette étape de la « restriction de la reconnaissance de l'antigène par le CMH ».

b) Sélection négative : une fois la sélection positive réalisée, les thymocytes vont rejoindre la médulla thymique pour y poursuivre leur développement et être soumis à la sélection négative (Campbell et al., 1999; Kim et al., 1998; Witt et al., 2005). Cette dernière permet d'éliminer les thymocytes autoréactifs, qui ont une trop forte affinité pour les complexes CMH-peptides du soi. Ceci se fait suite à leur contact avec des cellules dendritiques porteuses des complexes CMH-I/peptide ou CMH-II/peptide.

- **Thymocytes SP** (Simple positifs, *p.ex.* : CD4+/CD8- ou CD4-/CD8+) : ces cellules ont passé l'étape de sélection négative et ont perdu soit le CD4 soit le CD8 (Singer et al., 2008).

Finalement, sur les millions de différents thymocytes produits dans le thymus, environ seulement 2 % d'entre eux seront sélectionnés et sortiront du thymus pour générer le stock de lymphocytes T matures naïfs en périphérie (Goldrath and Bevan, 1999). Les lymphocytes T produits sont tous dotés de récepteurs qui leur permettront de reconnaître les pathogènes de manière spécifique.

L'activation des cellules T fait suite à la reconnaissance spécifique des antigènes par leur récepteur de surface TCR.

Les molécules de CMH-I exprimées par toutes les cellules nucléées présentent les fragments antigéniques aux cellules CD8+ (également appelées cellules cytotoxiques) : TCR-CMH-I.

Les cellules CD4+ ou « *T helper ou Th* », quant à elles, sont activées par les molécules de CMH-II portées par les cellules présentatrices d'antigène ou CPA (telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les lymphocytes B...) qui présentent l'antigène spécifique au TCR : TCR-CMH-II.

La réponse cellulaire qui s'ensuit sera fonction de l'état de maturation ou de différenciation des lymphocytes stimulés, de la nature de la substance stimulante et, enfin, de l'environnement dans lequel la stimulation survient.

Par ailleurs, les cellules T peuvent exprimer à leur surface, à côté du TCR, d'autres molécules dont la présence diffère selon le stade des cellules T (naïves, matures ou actives) (**Tableau 6**).

Tableau 6 : Les marqueurs des cellules T.

Molécules	Fonctions	Présence
TCR	Reconnaissance de l'antigène	Sur tous les lymphocytes T
CD3	Transduction du signal	Sur tous les lymphocytes T
CD2	Molécule d'adhésion	Molécules précoces de la lymphopoïèse T
CD5	Molécule d'activation des cellules T induisant la sécrétion de l'interleukine-2 (IL-2)	Molécules précoces de la lymphopoïèse T
CD7	Molécule non spécifique d'immaturité	Molécules précoces de la lymphopoïèse T
CD4	Permet la liaison avec les molécules CMH-II (présent sur 2/3 des lymphocytes)	Sur les lymphocytes T CD4+
CD8	Permet la liaison avec les molécules CMH-I (présent sur 1/3 des lymphocytes)	Sur les lymphocytes T CD8+

CD28	Intervient dans la coopération cellulaire T – B : -se lie au CD80 des lymphocytes B, mais aussi des autres cellules présentatrices d'antigène -induit la synthèse d'IL-2 par les lymphocytes CD4+	Sur les lymphocytes T CD4+
CD45 RO	Marqueur d'activation	Sur les lymphocytes T activés et mémoires
CD45 RA	Marqueur d'activation	Sur les lymphocytes T activés et mémoires
CD25	Récepteur pour l'IL-2 Apparaît après la stimulation par les mitogènes ou les virus.	Après activation des cellules T
HLA-DR	Marqueur d'activation	Après activation des cellules T
CD38	Marqueur d'activation	Après activation des cellules T

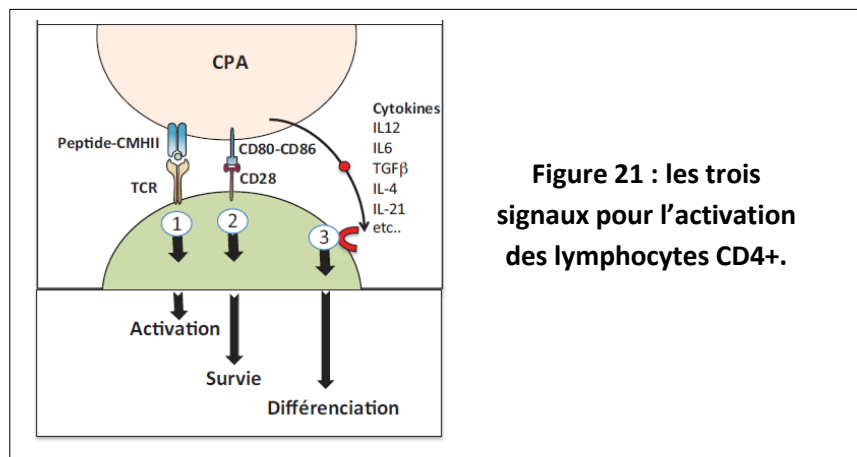
III.4. La différenciation des lymphocytes T auxiliaires (CD4+)

Les lymphocytes T auxiliaires ou T *helper* jouent un rôle fondamental dans l'initiation et le développement des réponses immunitaires adaptatives. Ils nécessitent trois signaux délivrés par les cellules présentatrices d'antigène (CPA) pour pouvoir s'activer et initier une réponse effectrice (**Figure 21**).

Le premier signal comprend l'interaction entre le TCR et le peptide spécifique associé à la molécule de CMH des cellules CPA (Jenkins et al., 2001). Il est essentiel pour l'activation des cellules T.

Le deuxième se résume par l'interaction entre le CD80-CD86 des cellules CPA et la molécule CD28 à la surface des LT, constituant ainsi le signal de costimulation nécessaire à la survie (Greenwald et al., 2005).

Le troisième signal consiste en une sécrétion de cytokines par les cellules CPA, conduisant à la différenciation des cellules T CD4 activées (Zhou et al., 2009) et à l'orientation de la réponse T effectrice.



La fonction principale des lymphocytes CD4⁺ effecteurs est la production de cytokines. Elles vont adapter la réponse immunitaire selon la nature du pathogène ou du signal de danger détecté. S'il est clairement établi que ces cellules représentent la source principale de cytokines, les sous-populations T impliquées dans ce phénomène sont diverses et varient en fonction de l'antigène qui stimule la réponse, des cellules présentatrices d'antigène impliquées et, enfin, du type de cytokines présentes dans l'environnement où se déroule la réponse (**Figure 22**).

Plusieurs sous-populations de LT effecteurs et régulateurs ont été définies comme des lignages distincts, avec des phénotypes et des fonctions spécifiques. On distingue aujourd'hui les LT effecteurs de type 1, 2, 9, 17, 22, T_{FH} et les LT régulateurs (Treg) (**Figure 22**).

Cellules TH1 :

Ces cellules sont caractérisées par l'expression du facteur de transcription (FT) T-bet (*Tbox transcription factor*) et la production de forte quantité d'IFN- γ , d'IL-2 et de TNF en moindre mesure. Leur réponse immune est dirigée contre les pathogènes intracellulaires tels que les bactéries, les virus ou les antigènes tumoraux (Del Prete, 1992).

L'IFN- γ et l'IL-12 initient la différenciation des cellules TH1 (Trichieri et al, 2003). En effet, la sécrétion de l'IL-12 par les cellules dendritiques (DC) activées va induire la production d'IFN- γ par les cellules NK. Cet IFN- γ va, à son tour, se lier à son récepteur à la surface du lymphocyte T, activer STAT1 et induire l'expression de T-bet qui va réguler la différenciation en TH1 (Lighvani et al., 2001).

Cellules TH2 :

Les cellules TH2 sont caractérisées par l'expression du facteur FT GATA3 et par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 principalement, ainsi que par la production de faibles

quantités d'IL-9, d'IL-10 et d'IL-25 (Luckheeram et al., 2012). La réponse adaptatrice de ces cellules est essentielle pour la protection contre les pathogènes extracellulaires (bactéries, toxines et parasites).

Les cellules TH2 aident à la commutation isotypique et la production d'IgG1 et d'IgE par les LB *via* la sécrétion des interleukines IL-4 et IL-13. Elles peuvent également, *via* la sécrétion d'IL-5 et d'IL-9, cytokines responsables du recrutement d'éosinophiles et de mastocytes respectivement, induire des maladies allergiques telles que l'asthme (Li et al., 2011; Sokol et al., 2009).

L'exposition des cellules T CD4 naïves à l'IL-4 et à l'IL-2 leur permet d'acquérir les fonctions effectrices de type TH2. En effet l'IL-4 va entraîner une cascade de signalisation conduisant à la phosphorylation de STAT6. Une fois phosphorylé, STAT6 est responsable de la transcription du gène codant pour le FT GATA3, le régulateur central de la différenciation en TH2 (Zhu et al., 2006). GATA3 permet à son tour la production d'IL-5 et d'IL-13 et renforce aussi celle d'IL-4. Il peut également réprimer la différenciation TH1 notamment en réprimant STAT4 et la transcription consécutive d'IFN- γ (Usui et al., 2003).

Cellules TH17 :

Les cellules TH17 sont caractérisées par l'expression du facteur FT Ror γ T et par la sécrétion de cytokines IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-21 et IL-22 (Ivanov et al., 2006). Elles sont impliquées dans la défense contre des bactéries extra-cellulaires et des champignons (Puel et al., 2011).

L'IL-6 et le TGF- β initient la différenciation des cellules TH17 (Veldhoen et al., 2006).

Cellules iTreg

Les iTreg (*inducible Treg*) sont des cellules régulatrices immunosuppressives caractérisées par l'expression du FT Foxp3 (*Forkhead box P3*), de la chaîne α du récepteur à l'IL-2 (CD25) ainsi que par la sécrétion des cytokines suppressives que sont le TGF- β , l'IL-10 et l'IL-35. Elles se distinguent des Treg naturelles dont la différenciation est achevée à la sortie du thymus (Weiss et al., 2012).

Cellules TH9

Les cellules TH9 sont induites en présence de TGF- β et d'IL-4. Elles sont essentiellement connues pour leur capacité à induire de fortes réponses proinflammatoires *in vivo* et de

forte sécrétion d'IL-9 (cytokine impliquée dans la sécrétion de mucus chez les patients atteints d'asthme) et d'IL-21 (Dardalhon et al., 2008).

Cellules TH22

Les TH22 ont été identifiées lors de l'inflammation au niveau de la peau. Ces cellules sécrètent l'IL-22, l'IL-13, l'IL-26 et le TNF- α mais pas d'IL-17, ni d'IFN- γ , ce qui les distingue des populations TH17 et TH1.

L'IL-22, cytokine ayant des propriétés cicatrisantes, joue un rôle majeur dans l'inflammation cutanée.

La différenciation des TH22 est induite en présence d'IL-6 et de TNF- α . Cependant les mécanismes moléculaires impliqués dans cette polarisation restent encore peu connus. Néanmoins le FT AhR (*Aryl hydrocarbon Receptor*) semble indispensable à l'initiation de leur différenciation (Ouyang et al., 2011).

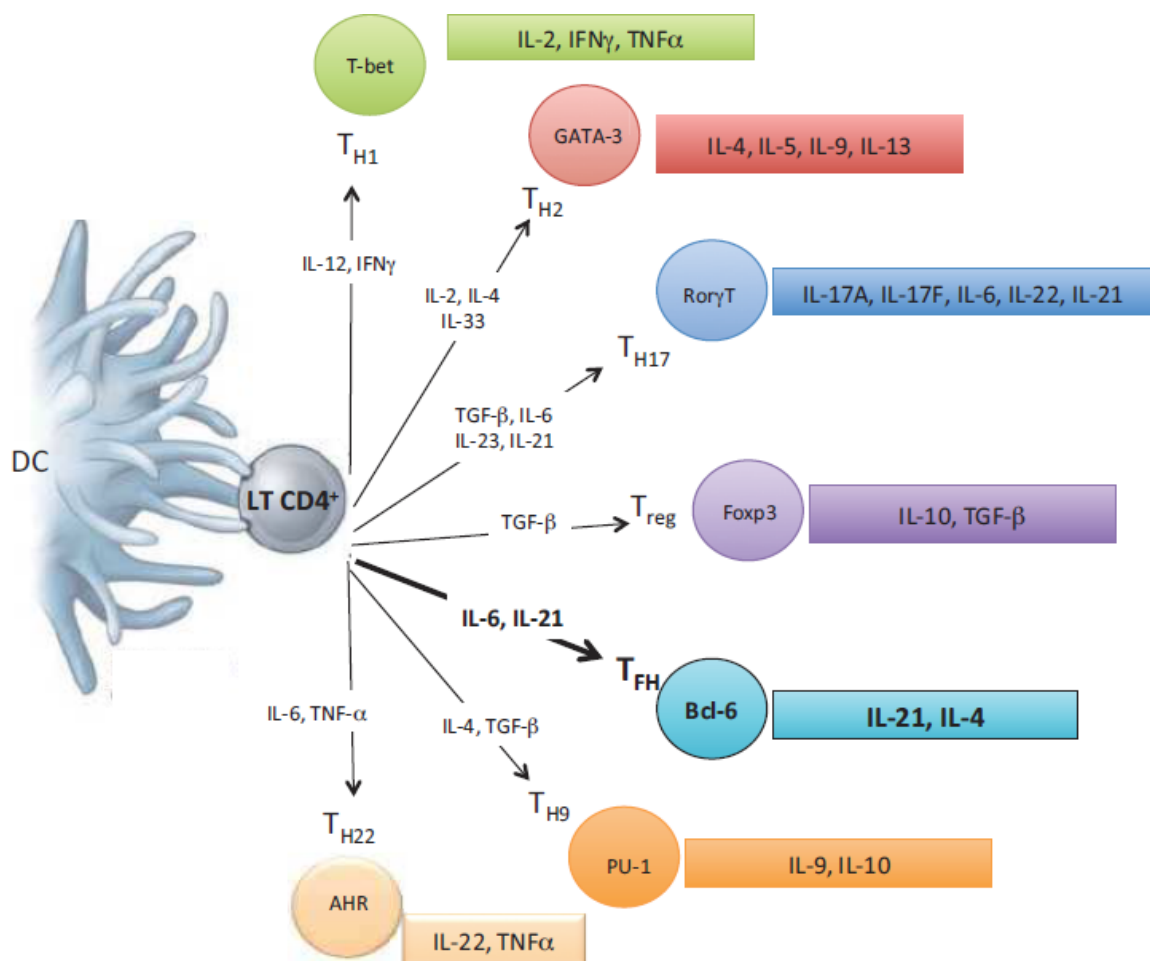


Figure 22 : Principaux sous-types de lymphocytes CD4 auxiliaires. Le facteur de transcription et la

cytokine « signature » de chaque sous-type de LT auxiliaire sont représentés respectivement par un rond suivi d'un rectangle de la même couleur. Modifié d'après (O'Shea and Paul, 2010).

III.5. Les cellules T_{FH}

Les cellules T_{FH} ou « *follicular helper* » correspondent à une sous-population fonctionnelle de cellules T effectrices (Th : T *helper*), présentant un phénotype qui les distingue des autres sous-populations T (Fazilleau et al., 2009; McHeyzer-Williams et al., 2009). Les T_{FH} sont caractérisées par les marqueurs suivants : CD4⁺ CD57⁺ CXCR5⁺ CCR7⁻. Elles sont spécialisées dans l'induction des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires. Elles jouent aussi un rôle essentiel dans la survie des lymphocytes B (LB) ainsi que dans la commutation de classe des immunoglobulines et l'hypermutation somatique, ce qui donne finalement des cellules plasmatiques de haute affinité et des cellules B mémoires (Kurosaki et al., 2015; McHeyzer-Williams et al., 2009) (**Figure 23**).

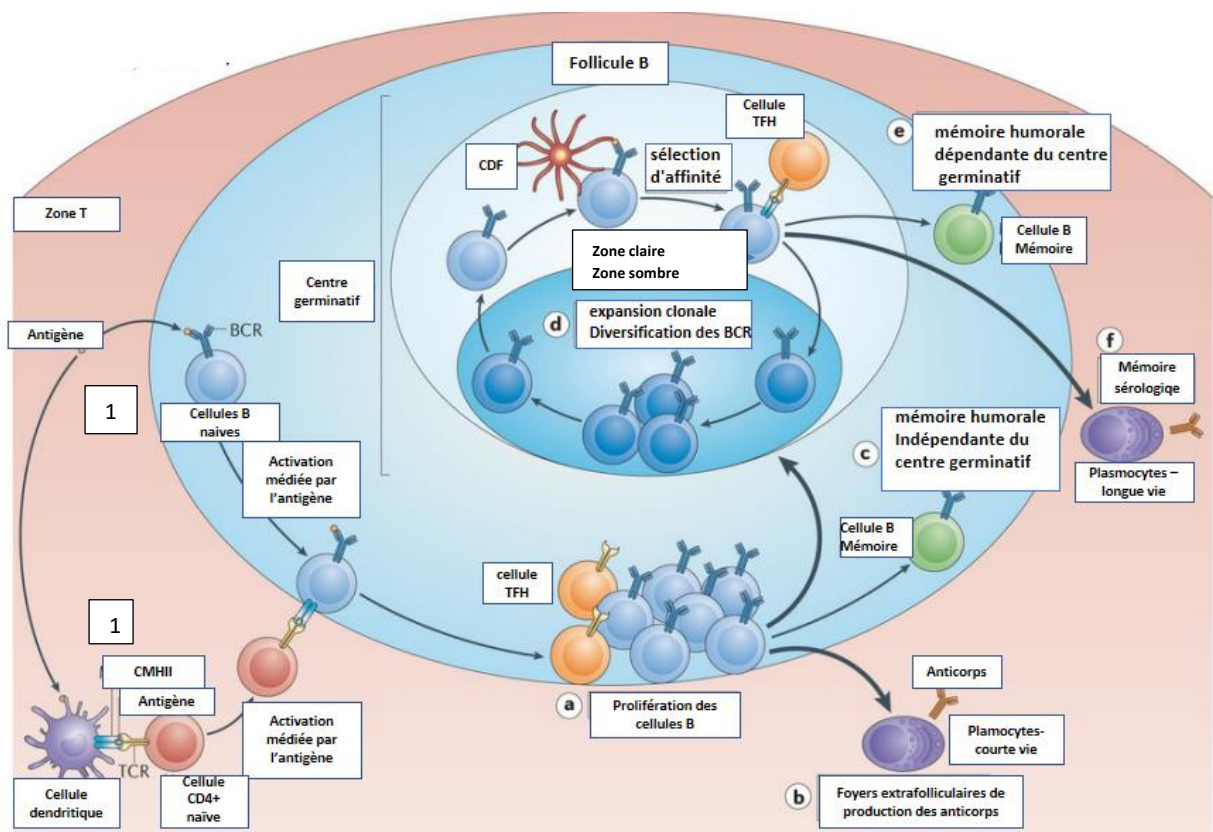


Figure 23 : Dynamique des cellules T_{FH} et B au sein du ganglion lymphatique. D'après (Kurosaki et al., 2015).

En effet, l'activation des cellules B et T par un antigène donné provoque la migration de ces cellules vers la frontière séparant la zone folliculaire B et la zone des lymphocytes T des organes lymphoïdes secondaires (**Figure 23**, partie 1). A ce moment, elles établissent des interactions (B-T) stables et les cellules B reçoivent des signaux auxiliaires des cellules T CD4+.

Les cellules B et T_{FH} activées migrent ensuite vers la région externe du follicule où les LB subissent une prolifération (partie a). Parmi les cellules proliférantes, quelques-unes se différencient en cellules plasmiques de courte vie (partie b) et donnent naissance à des foyers extrafolliculaires. D'autres peuvent se différencier en cellules B mémoires indépendantes du centre germinatif (CG) (partie c).

D'autre part, les cellules B activées peuvent retourner au follicule où elles subissent une prolifération rapide pour former le CG (partie d). Ceci se situe au niveau de la zone sombre du CG où se font l'expansion clonale des cellules B spécifiques de l'antigène et l'hypermutation somatique du BCR. Les LB résultants migrent ensuite vers la zone claire du CG où s'effectue la sélection d'affinité. Cette dernière se fait par l'interaction avec des cellules folliculaires dendritiques (CFD) porteuses des complexes immuns (CMH1/ peptide ou CMH2/ peptide) et des cellules T_{FH} spécifiques de l'antigène. Les cellules B deviennent ainsi matures et peuvent rentrer de nouveau dans le cycle du centre germinatif.

Des cellules B peuvent quitter le CG en tant que cellules B mémoires (partie e, cellules B mémoires dépendantes du CG), d'autres en tant que cellules plasmiques à longue vie (partie f) et contribuent à la mémoire sérologique.

III.6. Les marqueurs des cellules T_{FH} et leurs fonctions

Les cellules T_{FH} possèdent un facteur de transcription « signature » appelé BCL6 pour « *B Cell Lymphoma 6* ». Elles expriment également deux cytokines signatures, l'IL-21 et l'IL6, qui assurent leur fonction d'aide aux lymphocytes B (Linterman et al., 2010; Zotos et al., 2010) (**Figure 23**).

Le discernement du rôle fonctionnel des T_{FH} requiert la compréhension de l'intégration collaborative des diverses voies de signalisation mises en jeu au cours des interactions T_{FH} - B. Ces voies impliquent différents marqueurs des cellules T_{FH} tels que : les facteurs solubles

(IL-21, IL-4 et CXCL13), les protéines de surface (CD40L, PD-1, ICOS, SAP et CXCR5) et les marqueurs de centre germinatif (CD10 et BCL6).

Les marqueurs de cellules T_{FH} , ainsi que leurs fonctions sont récapitulés dans le **tableau 7**.

Tableau 7 : Les marqueurs des cellules T_{FH} .

Marqueurs	Type de la molécule	Fonctions
CXCR5 /CXCL13	CXCR5 : Récepteur de surface des cellules T_{FH}, lie la chimiokine CXCL13	- CXCL13 /CXCR5 à la surface des T_{FH} : essentiel à la migration des LB vers les follicules des organes lymphoïdes secondaires, leur activation et leur différenciation plasmocytaire. - CXCL13 /CXCR5 à la surface des LB du CG : induction de l'expression de la lymphotoxine ($LT\alpha\beta 2$), favorisant ainsi la maturation des CDF - CXCL13 : primordiale pour définir l'architecture fonctionnelle des CG.
	CXCL13 : Chimiokine sécrétée par les cellules B du CG, les CDF et les T_{FH}	
PD-1/PDL-1	PD-1 : Récepteur de surface des T_{FH}. Appartient à la famille des récepteurs de costimulation du TCR	PD-1/PDL-1 : Régulation négative de l'activation des lymphocytes T
	PDL-1 : Ligand pour PD-1	
ICOS/ICOSL	ICOS : Protéine de surface des T_{FH}. Appartient à la famille des récepteurs de costimulation du TCR	ICOSL des LB /ICOS des T_{FH} : -crucial pour le bon positionnement du T_{FH} à la jonction T/B -important pour l'entrée du T_{FH} dans le follicule et pour sa fonction d'aide aux cellules B, notamment en induisant la sécrétion d'IL-21
	ICOSL : Ligand exprimé par les cellules dendritiques et les lymphocytes B	
SAP	Molécule d'adaptation membranaire des T_{FH}, transduction de signal des cellules T	- Joue un rôle dans la : -Différenciation des cellules T_{FH} -Production d'IL-4 par les T_{FH}

		-Stabilisation des contacts des T_{FH} avec les LB du CG : ce qui aide à la différenciation des LB en plasmocytes et/ou B mémoires
CD40/CD40L	CD40 : Récepteur des cellules B	CD40L/CD40 : Impliqué dans le dialogue T_{FH} /LB : -Critique pour la survie des LB du CG en augmentant l'expression de Bclx (molécule anti-apoptotique)
	CD40L : Ligand à la surface des T_{FH}	-Ce complexe peut aussi conduire à la mort des cellules B <i>via</i> l'axe Fas/FasL (lors de l'absence de reconnaissance de l'Ag par les LB)
CD200/CD200R	-CD200 : Protéine de la superfamille des immunoglobulines membranaires des T_{FH}	CD200 / CD200R : un effet suppressif sur les réponses médiées par les lymphocytes T
	CD200R : Récepteur inhibiteur de la superfamille d'Ig ; porté par les cellules myéloïdes / monocytaires	
BCL-6	FT nucléaire « signature des T_{FH} »	Régulateur principal de la différenciation T_{FH}
c-MAF	FT nucléaire des T_{FH}	-Régulation de la transcription en induisant l'expression de l'IL-21, CXCR5, CXCR4, PD-1 et ICOS -Spécifique des cellules T_{FH}
IL-21/IL-6	Cytokines produites par les T_{FH}	Impliquées dans l'interaction (T_{FH} -LB) du CG : -Contrôle de la différenciation des cellules B du centre germinatif - Effet autocrine favorisant une différenciation optimale des T_{FH}

Abbreviations : **CXCL-13** : chemokine C-X-C motif ligand 13/ **CXCR5** : chemokine C-X-C motif receptor 5 / **ICOS** : Inducible T cell costimulatory/ **ICOSL** : ICOS Ligand / **SAP** : SLAM-Associated Protein/ **PDL-1** : Programmed death-ligand 1/ **PD-1** : programmed cell death/ **BCL-6** : B cell lymphoma 6 / **FT** : facteur de transcription/ **LB** : lymphocytes B/ **T_{FH}** : T folliculaire helper/ **LT** : lymphocyte T/ **CG** : centre germinatif/ **c-Maf** :

musculoaponeurotic fibrosarcoma / **IL-21** : interleukine 21 / **IL-6** : interleukine 6 / CDF : cellules dendritiques folliculaires.

Chapitre IV

Chapitre IV. Lymphome T angio-immunoblastique

IV.1. Introduction

Le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI) a été initialement décrit dans les années 1970 sous les noms de « lymphadénopathie angio-immunoblastique avec dysprotéinémie, LAID »; (Frizzera et al., 1974, 1975), de « lymphadénopathie immunoblastique » (Lukes and Tindle, 1975) ou de lymphogranulomatose X (LgX) (Lennert, 1979). Il a donc été assimilé à une réaction immunitaire anormale ou à une hyperplasie lymphoïde atypique. Dans les années 1980, des anomalies cytogénétiques récurrentes ont été mises en évidence telles que les trisomies des chromosomes 3 et 5 et la duplication du chromosome X (Kaneko et al., 1982). Des études ultérieures ont pu identifier la présence de réarrangements clonaux du récepteur des cellules T (TCR) (Lipford et al., 1987; Weiss et al., 1986). Ces découvertes ont permis de reconnaître la nature maligne de cette pathologie.

Le terme de « lymphome T angio-immunoblastique » a été introduit dans la classification de Kiel (Stansfeld et al., 1988).

Cette pathologie a ensuite été isolée au sein des lymphomes T périphériques « PTCL ou *Peripheral T-Cell Lymphoma* » dans la classification REAL « *Revised European American Lymphoma classification* » en 1994 (Harris et al., 1994) puis dans la classification de l'OMS en 2001 (Swerdlow et al., 2008).

Les études immunohistochimiques ainsi que les études d'expression de gènes ont identifié les lymphocytes T folliculaires auxiliaires « T_{FH} ou *Follicular Helper* » comme étant à l'origine du LTAI (Dupuis et al., 2006; de Leval et al., 2007; Marafioti et al., 2010; Piccaluga et al., 2007). Plus récemment, les cellules T_{FH} ont été reconnues comme étant à l'origine de deux autres sous-entités de PTCL : PTCL folliculaire et une partie des PTCL communs non spécifiés « *Not Otherwise Specified, PTCL-NOS* ». Ces cancers de lymphocytes T sont regroupés avec les LTAI selon l'OMS en 2016 sous un titre commun qui est : « lymphomes T ganglionnaires ou nodales » (Swerdlow et al., 2016).

IV.2. Épidémiologie

Le lymphome T angio-immunoblastique est une pathologie rare, agressive, émaillée de récurrences et rarement accessible à la thérapeutique. Il représente 15 à 20% des PTCL sachant

que ces derniers représentent 10 à 15 % de tous les lymphomes non hodgkiniens (LNH). Par conséquent, le LTAL représente environ 2% des LNH (Federico et al., 2013; Jaffe, 2009; Vose et al., 2008). Il survient principalement chez les personnes âgées avec un âge médian entre 59 et 65 ans (Sonnen et al., 2005; Tobinai et al., 1988) et un rapport homme/femme égal à 1.

Sur le plan géographique, il est plus répandu en Europe (28.7% de tous les cas de PTCL) qu'en Amérique du Nord (16%) ou en Asie (17.9%) (Federico et al., 2013; Vose et al., 2008). Jusqu'à présent, les raisons de cette hétérogénéité dans les différentes parties du monde demeurent inexpliquées. Aucun agent étiologique, aucun facteur de risque ou prédisposition ethnique n'a été identifié.

IV.3. Aspects cliniques

Du point de vue clinique, le LTAL se manifeste par une lymphadénopathie généralisée (dans environ 75% des cas) associée souvent aux symptômes B généraux (fièvre, sueurs nocturnes abondantes, perte de poids équivalente à plus de 10% du poids corporel au cours des 6 mois précédents). Ceci est suivi d'une hépatosplénomégalie (de 50 à 79% des cas). L'atteinte de la moelle osseuse (observée dans 50 à 70% des cas) représente une masse tumorale plus importante et est souvent associée à une plus grande incidence de symptômes B, d'hépatosplénomégalie et de cellules tumorales circulantes.

Des aspects dermatologiques comprenant le rash cutané (50% des cas), les lésions nodulaires, les plaques, le purpura et les lésions urticaires peuvent être présents (Lachenal, 2007).

Les patients présentent souvent une anémie hémolytique et une auto-immunité caractérisées par des cytopénies et la présence d'un ensemble d'anticorps (facteur rhumatoïde, anticorps anti-nucléaires, anticorps anti-muscles lisses) accompagnées d'une hypergammaglobulinémie polyclonale (50% des cas) (Iannitto et al., 2008; Jaffe, 2006). Certains patients atteints de LTAL présentent une plasmacytose sanguine polyclonale (Huppmann et al., 2013; Nagoshi et al., 2013).

Plusieurs aspects hématologiques tels que la thrombocytopénie, la lymphopénie, l'augmentation de la sédimentation des érythrocytes ainsi qu'une hyperéosinophilie sanguine sont aussi retrouvés (de Leval et al., 2010; Mourad et al., 2008).

D'autres manifestations neurologiques, rhumatologiques, pulmonaires, rénales et digestives peuvent être rapportées (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Manifestations pouvant accompagner le LTAI. Modifié d'après (Lachenal, 2007).

Atteintes	Manifestations
Neurologiques	- Polynévrite sensitive ou sensitivomotrice - Multinévrite - Polyradiculonévrite de Guillain-Barré
Rhumatologiques	- Arthralgies ou polyarthralgies - Monoarthrites ou polyarthrites
Pulmonaires	- Nodules pulmonaires
Rénales	- Elévation de la créatinine - Hématurie microscopique - Syndrome néphrotique
Digestives	- Douleurs abdominales - Ascite

La totalité de ces symptômes n'est pas toujours présente et la présentation peut être polymorphe.

Plus de 80% des patients présentent une maladie avancée au moment du diagnostic du LTAI (stade III-IV d'Ann Arbor) (Federico et al., 2013; Xu and Liu, 2014).

Le système de classification d'Ann Arbor est fréquemment utilisé pour les LNH. Il assigne un numéro de 1 à 4 à chaque stade, habituellement en chiffre romain, soit I, II, III ou IV. Le chiffre IV indique le stade le plus agressif.

Le travail de stadification des LTAI nécessite un bilan d'imagerie explorant le corps entier et une biopsie de la moelle osseuse.

IV.4. Aspects morphologiques, immunophénotypiques et moléculaires

Le diagnostic des LTAI n'est pas toujours simple. La présentation clinique peut imiter des néoplasies inflammatoires, auto-immunes ou autres pathologies lymphoïdes, en particulier

la maladie de Hodgkin. Le diagnostic ne peut être réalisé que sur une biopsie des ganglions lymphatiques.

La lymphadénopathie angio-immunoblastique est caractérisée par une destruction partielle ou complète de l'architecture ganglionnaire normale. Trois aspects ganglionnaires ont été décrits: les follicules hyperplasiques (type 1), les follicules « déplétés » (type 2) ou l'absence de follicule (type 3) (de Leval and Gaulard, 2008). Ces architectures pourraient témoigner de stades évolutifs différents.

Le LTAI est aussi caractérisé par :

- un important réseau vasculaire constitué de petites veinules « HEV ou *High Endothelial Venules* » (Willenbrock et al., 2007),
- la prolifération de cellules folliculaires dendritiques CFD (cellules très spécifiques du lymphome LTAI),
- et la présence d'un infiltrat cellulaire polymorphe diffus au sein duquel sont identifiés les cellules tumorales, ainsi que d'autres types cellulaires tels que les cellules épithélioïdes, les histiocytes, les éosinophiles, les plasmocytes, les lymphocytes CD8+ non néoplasiques et les immunoblastes souvent infectés par l'EBV (80 à 85 % des cas) (de Leval and Gaulard, 2008).

Les cellules néoplasiques sont des lymphocytes tumoraux T CD4+ de taille petite à moyenne avec un cytoplasme plus ou moins clair et abondant.

Ces cellules ainsi que les cellules endothéliales expriment fortement le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF-A ou *Vascular Endothelial Growth Factor*) (Agostinelli et al., 2008).

Le diagnostic des LTAI est consolidé par l'immunohistochimie des lymphocytes T tumoraux CD4+ matures : CD45RO+, TCRαβ+, CD4+, CD8-, CD2+, CD3+, CD5+ et CD7+. Une perte d'expression ou une expression diminuée a été notée pour le CD3 (3% des cas), le CD4 (5% des cas), le CD5 (2% des cas) ou le CD7 (98% des cas) (Lee et al., 2003).

Les cellules tumorales expriment les marqueurs caractéristiques des cellules T_{FH} tels que la chimiokine CXCL-13 et son récepteur CXCR5, , les molécules de surface PD-1, ICOS, CD200, SAP, et le facteur de transcription c-MAF (Bisig et al., 2012; Dupuis et al., 2006; Grogg et al., 2006; Roncador et al., 2007). Elles expriment également des marqueurs du centre germinatif comme le CD10 (Attygalle et al., 2004) et BCL6 (Ree et al., 1999).

Ces immunophénotypes sont utiles pour distinguer les LTAI des PTCL communs non spécifiés ainsi que des lymphomes anaplasiques à grandes cellules (**Tableau 9**).

Tableau 9 : Diagnostic différentiel des lymphomes LTAI, PTCL-NOS et anaplasique à grandes cellules.

Maladie	Etude immunohistochimique
Lymphome T angio-immunoblastique (LTAI)	CD4+ ou mix CD4/CD8 CD10+/-, BCL6+/-, CXCL13+, PD1+, ICOS+ Hyperplasie des CFD CD21+ Cellules immunoblastiques B CD20+ EBV+
Lymphome T périphérique, sans autre spécificité (PTCL, NOS)	CD4>CD8 Perte antigénique T fréquente (CD7, CD5, CD4/8, CD52) CD30-/+ CD56-/+ CD10-, BCL6-, CXCL13-, PD1-
Lymphome anaplasique à grandes cellules	CD30+, ALK+/- EMA+, CD25+, granules cytotoxiques+ CD4+/-, CD3-/+, CD43+

Abréviations : **CFD** : Cellules Folliculaires Dendritiques, **ALK** : *Anaplastic Lymphoma Kinase*, **EMA** : *Epithelial Membrane Antigen*.

Des études transcriptomiques ont montré une signature particulière des LTAI. Cette signature est caractérisée par une forte impression du micro-environnement de la tumeur. Elle est constituée par la surexpression des gènes liés aux cellules B, aux cellules plasmatiques et aux cellules folliculaires dendritiques. Elle est également caractérisée par la surexpression des gènes de molécules de la matrice extracellulaire MEC (laminine, collagène, fibronectine), des enzymes et facteurs impliqués dans la synthèse et le remodelage de cette matrice (facteur de croissance transformant- β , facteur de croissance des fibroblastes, métalloprotéinases) et des molécules d'adhésion cellulaire (cadhérines, intégrines). Les gènes de la vasculogénèse (VEGF-A) et de la coagulation (de Leval et al., 2007; Piccaluga et

al., 2007) sont également surexprimés. Cette signature particulière de gènes constitue un élément supplémentaire pour différencier le LTAI du PTCL-NOS.

IV.5. Le micro-environnement du LTAI

La relation entre les cellules tumorales et le TME « *Tumor Microenvironment* » est intrigante. L'incapacité d'établir une lignée cellulaire avec le lymphome LTAI *in vitro* suggère que les cellules tumorales dépendent de leur TME pour leur survie et leur prolifération. Ceci suggère que le TME joue un rôle de premier plan dans le développement du LTAI mais cette « piste » n'a pas encore été complètement explorée.

Le TME comprend des cellules B, des cellules folliculaires dendritiques, des monocytes, des plasmocytes, des éosinophiles, des macrophages, des cellules T non néoplasiques et des immunoblastes qui pourraient interagir avec les cellules tumorales (T_{FH}) (**Figure 24**).

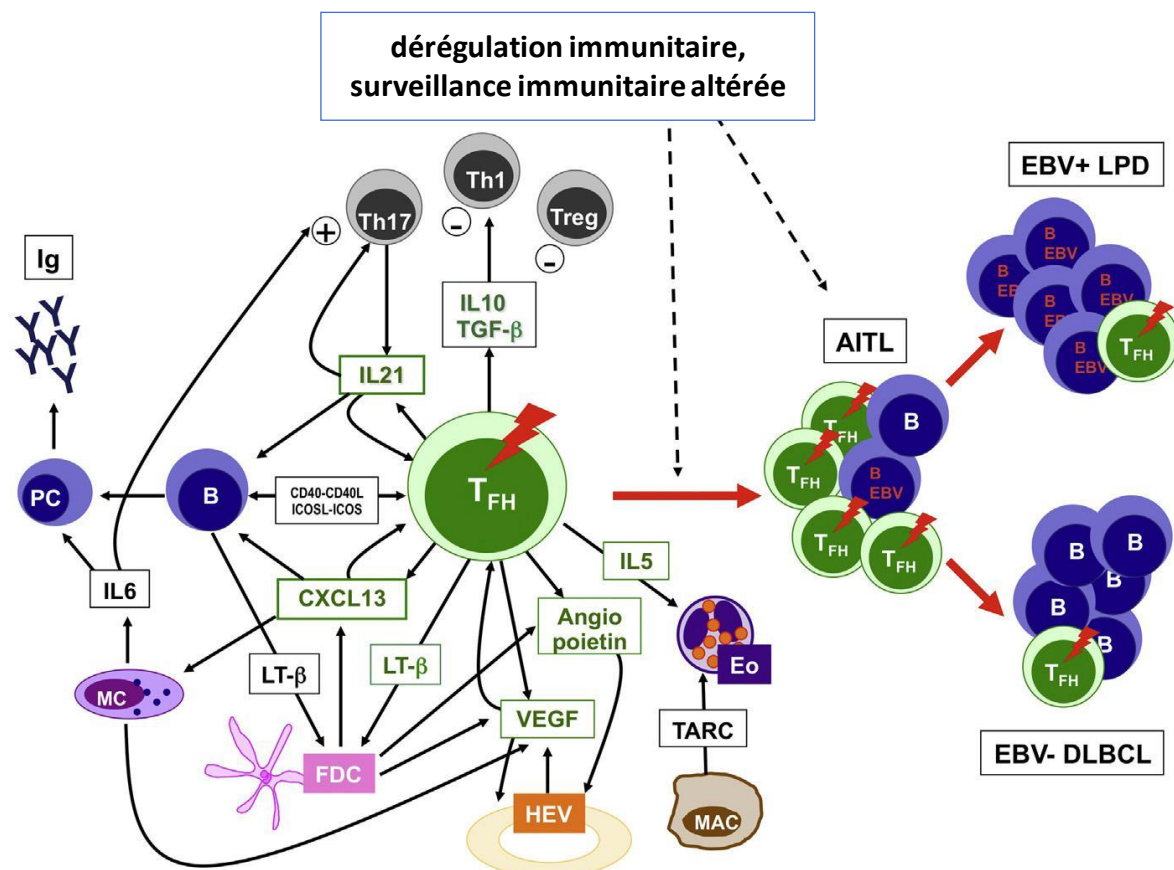


Figure 24 : Modèle théorique de la pathogénèse du LAI montrant les interactions entre les cellules néoplasiques et les différents composants cellulaires du microenvironnement.

Abréviations : B, B cell ; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma ; EBV, Epstein-Barr virus; Eo, eosinophile; FDC, follicular dendritic cell; HEV, high endothelial veinule; Ig, immunoglobulins; LPD, lymphoproliferative disorder; MAC, macrophage; MC, mast cell; PC, plasma cell; TFH, follicular helper T cell; Th, T helper cell. Modifié D'après (Gaulard and de Leval, 2014) :

Interaction T_{FH} – cellules de l’environnement

1) Cellules B

L’interaction (B-T_{FH}) peut être médiée par contact *via* des paires de ligands-récepteurs membranaires telles que ICOS-ICOS-L et CD40-CD40L. Des rosettes de cellules T néoplasiques peuvent être retrouvées autour des cellules B.

Les cellules T_{FH} sont également capables de sécréter des facteurs solubles pouvant être impliqués dans le dialogue B-T_{FH}. Par exemple, la chimiokine CXCL13 sécrétée par les cellules T_{FH} néoplasiques peut favoriser la prolifération des cellules B et la différenciation plasmocytaire. Elle pourrait agir aussi dans la stimulation autocrine des T_{FH}.

Une sécrétion accrue de CXCL13 est responsable des manifestations dysimmunes communes des LTAI, en particulier l’hypergammaglobulinémie polyclonale et l’anémie hémolytique.

Par ailleurs, la chimiokine CXCL13 induit la sécrétion de lymphotoxine bêta (LT-β) par les cellules B, mais aussi par les cellules T_{FH}. Ce qui pourrait entraîner la prolifération importante des cellules folliculaires dendritiques observée dans les LTAI (Foss et al., 1995).

L’IL-21, un autre facteur soluble sécrété par les cellules T_{FH}, peut exercer un effet autocrine sur les T_{FH} CD21R+, et régule positivement les cellules B (Sato et al., 2013).

Ces interactions B-T_{FH} apportent une aide critique aux cellules B pour l’induction de l’immunité humorale de haute affinité (comme déjà vu dans le chapitre III).

2) Cellules folliculaires dendritiques CFD/ mastocytes/système angiopoïétine

Les cellules CFD et les mastocytes forment des sources importantes de facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) (Fukushima et al., 2001; Tripodo et al., 2010).

La surexpression de ce facteur agit probablement comme un médiateur clé de la vascularisation observée dans le LTAI (de Leval et al., 2007; Piccaluga et al., 2007).

D’autre part, les cellules CFD et T_{FH} peuvent exprimer l’angiopoïétine 1, une molécule agissant en synergie avec le VEGF et également impliquée dans la formation des vaisseaux sanguins, ce qui potentialise l’angiogenèse observée dans les LTAI (Konstantinou et al., 2009).

3) Cellules plasmatisques

L'interleukine-6 (IL-6) produit par les cellules T_{FH} pourrait stimuler les plasmocytes et augmenter ainsi leur sécrétion d'anticorps. Ce qui explique en partie la présence d'une hypergammaglobulinémie marquée dans les LTAI (Hsu et al., 1993).

4) Eosinophiles

Une surexpression de l'interleukine-5 (IL-5) a été démontrée dans les ganglions lymphatiques des LTAI. Cette cytokine est produite par les cellules T_{FH} et est décrite comme un médiateur potentiel de l'éosinophilie (augmentation du nombre des éosinophiles dans le sang) (Ohshima KHaraoka et al., 2000).

5) Macrophages

Le lymphome LTAI comprend un nombre variable de macrophages. Certains sont caractérisés par une teneur élevée en cellules épithélioïdes en grappes (macrophages ayant perdu leur fonction de déplacement et de phagocytose mais possédant une importante fonction sécrétoire).

Les macrophages associés au LTAI présentent majoritairement des phénotypes M1 ou M2 qui correspondent à ses formes actives (Niino et al., 2010).

6) Cellules T non néoplasiques : CD8+ ; CD4+ (Th17, Th1 et Treg)

Les patients atteints de LTAI ont un important déficit immunitaire cellulaire T, ce qui explique la raison de survenue d'infections (Delfau-Larue et al., 2012; Pizzolo et al., 1987).

Concernant les cellules CD8+ observées au sein du TME, à ce jour, nous ne savons pas si elles jouent un rôle dans le contexte immunosuppresseur inhérent à la maladie et/ou si elles peuvent exercer des propriétés antitumorales.

Un manque de cellules Treg accompagné d'une accumulation de cellules Th17 (éventuellement stimulées par les IL-21 et IL-6) ont été signalés dans les tissus de LTAI. Ils pourraient contribuer au micro-environnement proinflammatoire et immunosuppresseur de cette pathologie (Niino et al., 2010; Tripodo et al., 2010).

Le TGF- β et l'IL-10 produits par des cellules T_{FH} normales sont connus pour supprimer les réponses des cellules T en inhibant la prolifération et les fonctions des cellules TH1.

7) Immunoblastes

Les immunoblastes ayant donné le nom à la maladie sont le plus souvent infectés par l'EBV.

La réactivation de l'EBV pourrait se produire dans le contexte d'une réponse immunitaire dérégulée, ce qui favorise également la prolifération non contrôlée des cellules B et conduit aux lymphoproliférations (détaillé dans la partie IV.7.3).

IV.6. Pronostic

Le LTAI a une évolution clinique agressive. La survie médiane est inférieure à 3 ans. Seuls 10 à 30% des patients sont vivants 5 ans après le diagnostic (Vose et al., 2008). Les patients succombent souvent à des complications infectieuses résultant des dérégulations immunes associées au LTAI. Ils peuvent aussi développer des lymphoproliférations B associées à l'EBV. Dans la plupart des cas, il s'agit d'un lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) ou des tumeurs à cellules plasmocytaires (de Leval and Gaulard, 2008).

Par conséquent, la mortalité liée aux LTAI est dûe majoritairement aux complications associées aux LTAI plutôt qu'à la tumeur elle-même (Nathwani et al., 1978; Vose, 2008).

Dans une étude récente, Iqbal et ses collaborateurs, ont démontré qu'une signature de gènes liée au TME pourrait jouer un rôle important dans le pronostic des LTAI (Iqbal et al., 2010).

En effet, un mauvais pronostic des LTAI, a été caractérisé par une forte expression de gènes immunosuppresseurs tels que le VSIG4 « *V-set and immunoglobulin domain containing 4* », un inhibiteur puissant de l'activation des lymphocytes T et sécrété par les cellules dendritiques. Mais aussi des récepteurs ou des molécules d'adhésion cellulaire qui médient les signaux prolifératifs, y compris les PDGFR α et PDGFR β « *Platelet-Derived Growth Factor Receptor, alpha or beta polypeptide* ».

En revanche, les gènes BTLA4 « *B- and T-Lymphocyte Attenuator 4* » et SYK « *Spleen Associated Tyrosine Kinase* », ayant des effets inhibiteurs sur les fonctions des cellules myéloïdes, sont fortement exprimés dans le groupe avec un bon pronostic (Iqbal et al., 2010).

Ces résultats appuient le rôle important du microenvironnement et fournissent une justification pour l'utilisation de nouvelles thérapies qui le cible.

Facteurs pronostiques

Un indice pronostique pour les patients atteints de LTAI a été récemment testé. Il comprenait l'âge (>60), le statut de performance de l'ECOG « *Eastern Cooperative Oncology*

Group » (>2), les sites extra-ganglionnaires de la maladie (>1), la présence de symptômes B et le nombre de plaquettes (<150 G/L) en tant qu'entités définies (Federico et al., 2013) .

Ainsi ces variables permettent de différencier un groupe à faible risque (0-1 facteurs de risque) avec un taux de survie globale à 5 ans de 44% et un groupe à haut risque (2-5 facteurs de risque) associé à une survie globale à 5 ans de 24% (Federico et al., 2013).

IV.7. Pathogenèse des LTAI

IV.7.1. Facteurs de risque

L'étiologie et la pathogenèse des LTAI sont inconnues. L'atteinte des patients ayant des antécédents de maladie auto-immune (lupus systémique, polyarthrite rhumatoïde et syndrome de Gougerot-Sjögren) par le lymphome LTAI a été rarement décrite (Ambepitiya, 1989; Pautier et al., 1999; Saito et al., 2005). Aucune relation n'a pu être établie entre ces maladies.

Un rapport entre une prise médicamenteuse et l'apparition des symptômes, notamment cutanés, a été mis en évidence dans 5 à 33 % des cas de la littérature (Frizzera et al., 1974; Martel et al., 2000; Tobinai et al., 1988). Il s'agit en particulier de la prise d'antibiotiques, comme l'amoxicilline (Frizzera et al., 1974; Martel et al., 2000; Seehafer et al., 1980). Il est probable que ces traitements soient des facteurs provoquant une réaction inflammatoire systémique favorisée par le dérèglement immunologique associé au LTAI, plutôt que des facteurs de risque présumés.

IV.7.2. Aspects moléculaires

Clonalité

Un réarrangement clonal des gènes de TCR peut être détecté dans 75 à 90% des cas (Swerdlow et al., 2008). L'absence de clone T dans les autres 10 à 25% pourrait être le résultat d'une faible proportion de cellules néoplasiques, se heurtant à la sensibilité des techniques actuellement utilisées.

Un réarrangement clonal des gènes du BCR est retrouvé dans 25 à 30% des cas (Swerdlow et al., 2008).

Anomalies cytogénétiques : mutations ponctuelles

Les événements précis entraînant l'oncogenèse du LTAI ne sont pas entièrement compris. De nombreuses études ont pu mettre en évidence des anomalies moléculaires récurrentes parmi lesquelles les mutations au niveau des gènes de méthylation de l'ADN. Ce qui suggère que les modifications épigénétiques pourraient jouer un rôle important dans l'oncogénicité des LTAI. Les gènes impliqués, leurs fonctions ainsi que les conséquences de leurs mutations sont représentés dans le **tableau 10**.

Tableau 10 : Mutations épigénétiques identifiées dans les LTAI.

Gène	Fonction	Conséquence des mutations
TET2	Oxygénase dépendante du 2-oxoglutarate et de Fe(II)/contrôle de la méthylation de l'ADN	Perte de fonction
DNMT3A	Méthylation <i>de novo</i> durant le développement	Perte de fonction
IDH2	Catabolise la transformation de l'isocitrate en 2-oxoglutarate	Gain de fonction
RHOA	Petite GTPase/ polarisation, migration, contrôle des éléments dynamiques du cytosquelette	Gain de fonction-dominant négatif

Abréviations : TET2 : ten-eleven translocation/ DNMT3A : DNA (cytosine-5-) methyltransferase 3 alpha/ IDH2 : Isocitrate Dehydrogenase/ RHOA : Ras homolog gene family member A.

Les mutations de *TET2* « *Ten-Eleven Translocation-2* » surviennent chez 50 à 80% des patients atteints de LTAI, en fonction de la sensibilité de la méthode utilisée pour le séquençage. Ces mutations sont réparties sur la totalité du gène et sont de nature inactivatrice (mutations non-sens dans les régions conservées et les sites d'épissage) (Lemonnier et al., 2012; Odejide et al., 2014; Quivoron et al., 2011; Sakata-Yanagimoto et al., 2014).

Des mutations d'*IDH2* « *Isocitrate Dehydrogenase 2* » ont été détectées chez 20 à 30% des patients. Ces mutations inhibent indirectement les oxydases dépendantes du 2-oxoglutarate et du fer, telles que les protéines de la famille TET, ce qui entraîne une hyperméthylation de l'ADN et des histones (Couronné et al., 2012; Lemonnier et al., 2012; Sakata-Yanagimoto et al., 2014).

Des mutations inactivatrices de *DNMT3A* « *DNA Methyltransferase 3A* » sont observées chez 20 à 30% des patients avec un LTAI. (Couronné et al., 2012; Odejide et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014).

Concernant la protéine RHOA « *Ras homolog gene family member A* », il s'agit d'une guanosine triphosphatase (GTPase) impliquée dans la réorganisation du cytosquelette *via* l'activation de voies de signalisation différentes.

Une mutation spécifique de *RHOA* (G50T : une thymine qui remplace la guanine à la position 50), consiste en une substitution Gly17Val au niveau protéique. Cette mutation est détectée chez 50 à 70% des patients atteints de LTAI et semble avoir un effet négatif dominant sur la fonction de la protéine RHOA (Cairns et al., 2012; Couronné et al., 2012; Palomero et al., 2014; Sakata-Yanagimoto et al., 2014).

In vitro, Sakata-Yanagimoto et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que la mutation Gly17Val est associée à une augmentation de la prolifération et de la capacité d'invasion des cellules tumorales du LTAI (Sakata-Yanagimoto et al., 2014).

D'autres anomalies moléculaires ont été rapportées dans le LTAI telles que les mutations affectant les gènes liés à la signalisation du TCR (FYN) et les récepteurs co-stimulants (CD28) (Lee et al., 2015; Manso et al., 2014; Palomero et al., 2014; Rohr et al., 2016). En effet, 85 échantillons de patients ont été étudiés par séquençage haut débit ciblant un panel génétique enrichi en éléments de signalisation TCR. Ces mutations ont été détectées chez 50% des patients atteints de LTAI (Vallois et al., 2016).

Tableau 11 : Autres anomalies moléculaires observées dans les LTAI.

Gène	Fonction	Conséquences des mutations
FYN	Appartient à la famille SRC kinase /signalisation du TCR, prolifération et différenciation T	Gain de fonction
CD28	Interactions entre les cellules immunitaires	Perte de fonction

Bien qu'aucune corrélation avec les caractéristiques cliniques ou un impact significatif sur la survie n'ait été observée, la présence de mutations liées au TCR est corrélée avec la progression précoce de la maladie (Vallois et al, 2016).

La protéine de fusion CTLA4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte-associated Antigen*)-CD28 a également été trouvée dans 50% des LTAI (Yoo et al., 2016). Elle est composée du domaine extracellulaire de CTLA4 et de la région cytoplasmique de CD28 et est probablement capable de transformer des signaux inhibiteurs en signaux stimulateurs pour l'activation des lymphocytes T. Pourtant, l'incidence élevée de cette variante a été signalée dans les cas provenant d'Asie, d'où la nécessité qu'elle soit confirmée par d'autres études (Gong et al., 2016).

Globalement, toutes les observations citées dans cette partie suggèrent que les mutations décrites peuvent perturber la régulation normale et favoriser ainsi l'oncogenèse des LTAI.

Anomalies cytogénétiques

Les aberrations chromosomiques sont détectées dans la majorité des cas de LTAI, 70% avec une cytogénétique conventionnelle (caryotype) et 90% avec la technique FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*).

Les trisomies 3, 5 et 21, la présence d'un chromosome X supplémentaire et la perte du bras long du chromosome 6 sont les anomalies cytogénétiques les plus fréquentes dans les LTAI (90% des cas) (Gödde-Salz et al., 1987; Kaneko et al., 1982; Lepretre et al., 2000; Nelson et al., 2008; Schlegelberger et al., 1994). A ce jour, ces anomalies n'ont été étudiées que dans les localisations ganglionnaires.

IV.7.3. La relation entre l'EBV et le lymphome LTAI

La présence de l'EBV est estimée au moins à 80 % des biopsies issues de lymphomes LTAI (Anagnostopoulos et al., 1992; Weiss et al., 1992). Les cellules B infectées par l'EBV sont des immunoblastes CD20+ et peuvent imiter morphologiquement et phénotypiquement les cellules B de Reed-Sternberg du lymphome de Hodgkin (HRS).

La relation entre l'infection par l'EBV et le développement des LTAI n'est toujours pas claire et on ignore si les cellules B EBV+ sont impliquées dans la lymphomagenèse des LTAI ou ne sont que des marqueurs de l'immunodéficience induite par le lymphome.

Plusieurs données suggèrent que la présence de l'EBV est un phénomène secondaire au lymphome, en relation avec le déficit de l'immunité cellulaire, et non un fait causal (Huang et al., 2012; Zhou et al., 2007).

En effet, de nombreux patients atteints de LTAI présentent des caractéristiques d'immunodéficience résultant de la tumeur elle-même plutôt que d'une condition préexistante. Cette immunodéficience se caractérise par une baisse de cellules T circulantes, un rapport CD4/CD8 inversé (inférieur à 1) avec des fonctions défectueuses des cellules T *in vivo* et *in vitro* (Pizzolo et al, 1983; Ganesan et al, 1987). Ce dysfonctionnement immunitaire sous-jacent pourrait constituer l'arrière-plan pour l'infection ou la réactivation de l'EBV ou d'autres virus (tels que le HHV-6) chez les patients atteints de LTAI.

L'EBV à l'état de latence dans les lymphocytes B pourrait être réactiver du fait de l'immunodépression, ce qui conduit à une prolifération B polyclonale. Dans certains cas, cette réactivation provoque une prolifération oligo ou monoclonale B, qui induit l'apparition secondaire de lymphome B associé à l'EBV. Ces lymphomes comprennent des cellules B de type Reed-Sternberg en combinaison avec une expansion de la population de cellules T tumorales. L'EBV y exprime un programme de latence de type 2 ou 3, avec expression de LMP-1 et le plus souvent EBNA-2, visible en immunohistochimie, et des transcrits EBER détectables par hybridation *in situ* (Zettl et al., 2002).

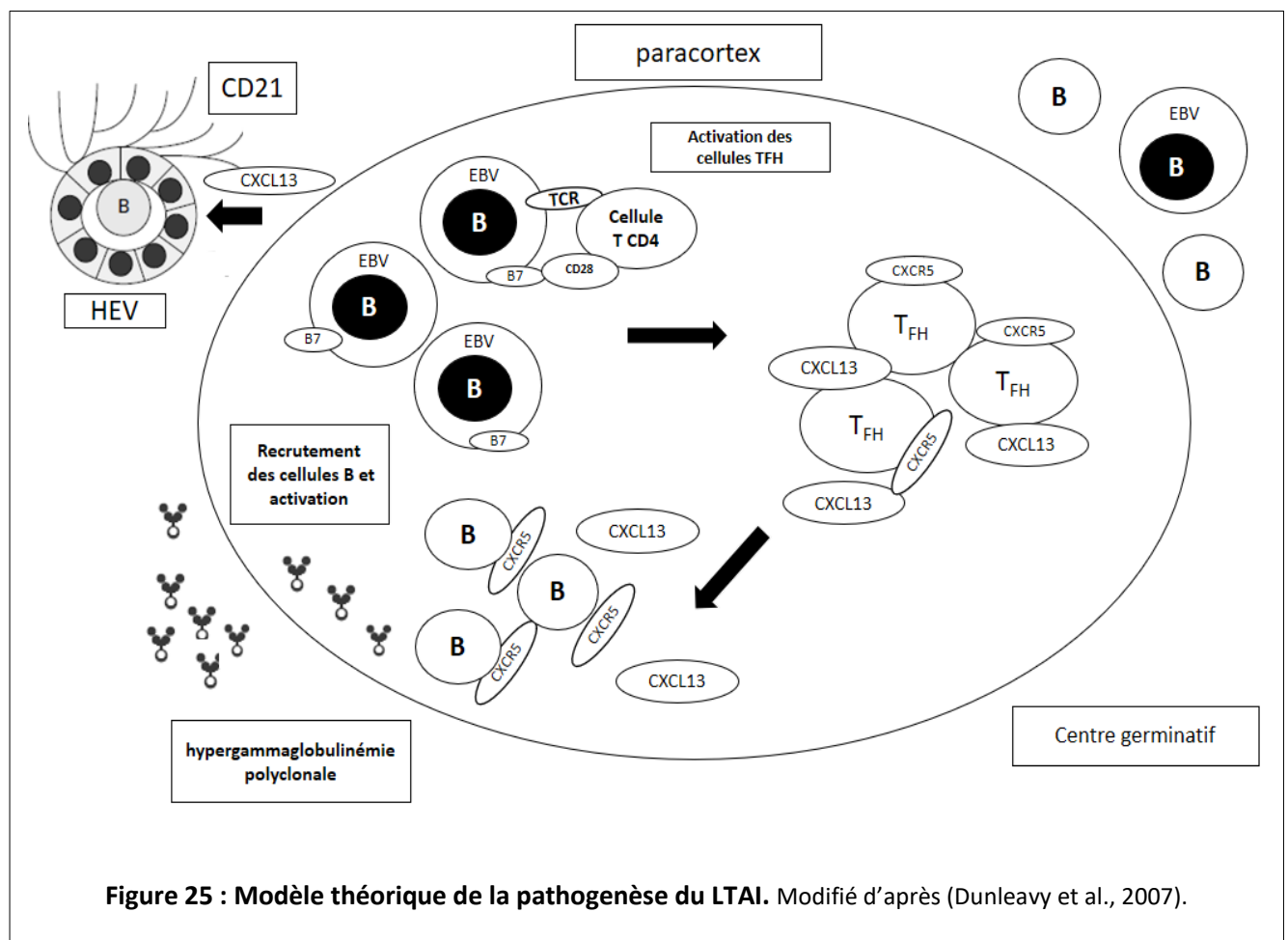
Jusqu'à aujourd'hui et parmi les cas signalés ayant les 2 lymphomes T et B, la majorité ne présente que le lymphome LTAI lors de la biopsie initiale et montre un lymphome B (avec ou sans LTAI coexistant) sur la biopsie de suivi. L'intervalle de temps entre les deux tumeurs variait de 5 à 96 mois (Abruzzo et al., 1993; Cheng and O'Connor, 2017; Gru et al., 2015; Lome-Maldonado et al., 2002; Tan et al., 2006).

Il a été montré dans d'autres études que l'événement initiateur de certains lymphomes B, à titre d'exemple les lymphomes de la zone marginale de l'estomac et de la rate, est entraîné par un antigène (Hermine et al., 2002; Parsonnet et al., 1994).

En se basant sur ces études, Dunleavy et ses collaborateurs ont alors émis l'hypothèse qu'il pourrait exister un rôle étiologique possible de l'EBV dans les LTAI et que la prolifération clonale des lymphocytes T pourrait initialement correspondre à un processus spécifique d'antigène (Dunleavy et al., 2007) (**Figure 25**). Cette supposition est basée sur les faits de la présence très précoce des cellules B EBV+ au cours de la maladie (Jaffe, 2006; Weiss et al., 1992) et de l'association presque constante des LTAI avec l'infection par l'EBV (Anagnostopoulos et al., 1992; Smith et al., 2000a).

En effet, les cellules B EBV+ présentent les protéines virales (telles que EBNA-1 et LMP-1) en association avec les molécules du CMH-II aux cellules T_{FH} (Long et al., 2005; Widney et al., 2003) (**Figure 25**). Cet événement pourrait fournir des signaux stimulateurs pour l'activation des cellules T_{FH} conduisant à la production de CXCL13. Cette chimiokine facilite le recrutement des cellules B dans le ganglion par interaction avec les HEV et les capillaires dans les centres germinatifs. Les cellules B se développent dans le paracortex et s'activent. Ce qui permet la création d'une boucle d'amplification. Dans cette boucle, une cellule B EBV+ pourrait fournir le stimulus menant à l'émergence d'une cellule T_{FH} indépendante de l'antigène.

Bien que ce modèle soit hypothétique, il fournit une explication rationnelle de la pathogenèse des LTAI et explique l'interaction complexe de l'EBV, des lymphocytes T, des cellules B et des cytokines dans cette maladie.



Par ailleurs, il est possible que l'infection par l'EBV puisse jouer un rôle primordial dans la progression de la maladie par des mécanismes paracrines (Zhou et al., 2007).

Plus particulièrement, l'EBV code pour des cytokines, des chimiokines et des récepteurs homologues à ceux qui sont produits chez l'homme. A titre d'exemple, il code pour la protéine virale BCRF1 qui est un homologue de l'IL-10 (Moore et al, 1990).

L'EBV peut également moduler la production des cytokines, des chimiokines et des récepteurs par les lymphocytes et les cellules inflammatoires.

Plusieurs études ont montré que l'EBV peut moduler la production et la réponse aux cytokines et aux chimiokines telles que IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TNF- α et CCL5 par de nombreux types cellulaires (Gosselin et al, 1992; Flamand et al, 1995; Klein et al., 1996; Arena et al, 1999; Arena et al, 2001, Uchihara et al., 2005).

D'autres découvertes ont montré l'éventuelle existence de populations de cellules B clonales et oligoclonales EBV négatif dans les LTAI, ce qui suggère que d'autres mécanismes que l'infection par l'EBV contribuent à l'expansion de la population de cellules B dans les LTAI (Gru et al., 2015; Nicolae et al., 2013).

IV.8. Traitement

Le caractère unique du LTAI ne réside pas seulement dans sa biologie mais aussi au niveau de son traitement. Compte tenu de la rareté de ce lymphome, les essais thérapeutiques prospectifs et randomisés sont exceptionnels. La plupart des données concernant le traitement sont basées sur des études rétrospectives, incluant un petit nombre de patients et sur des observations cliniques isolées.

Il n'existe pas de traitement standard pour le LTAI. Les traitements de première ligne sont basés sur des polychimiothérapies de type CHOP (Cyclophosphamide, Doxorubicine, Vincristine et Prednisone) (Vose et al., 2008; Simon et al., 2010).

Des régimes plus intensifs combinant CHOP avec d'autres molécules anticancéreuses ont été étudiés dans des cas de PTCL.

Avec des limites indiquées pour les comparaisons entre les études, il apparaît que l'ajout d'étoposide à CHOP (CHOEP) pourrait conduire à des rémissions plus profondes et un taux de réponse globale élevé (*ORR : Overall Response Rates*) à 82% (d'Amore et al., 2012).

Quant à la combinaison de Romidepsine avec CHOP, il a été montré que le taux de rémission complète (51%) était moins bon que lors de l'administration de CHOP seul (Dupuis et al., 2015).

Le Bortézomib a été combiné avec CHOP dans un essai clinique de phase 2 dans les PTCL. Les LTAI représentaient 17% de la population étudiée et une amélioration de survie globale de 3 ans a été obtenue, comparativement à d'autres populations PTCL non-LTAI (Horwitz et al., 2016).

D'autres études ont cherché à substituer des traitements plus efficaces dans les cas de PTCL à la chimiothérapie CHOP. Les régimes PEGS (cisplatine, étoposide, gemcitabine, méthylprednisolone) et CEOP (cyclophosphamide, épirubicine, vincristine, prednisone) ont été inclus dans ces études. Ces traitements ont donné, respectivement, une réponse dans 33 et 25% des cas de LTAI (Advani et al., 2016; Mahadevan et al., 2013). Ces résultats montrent que ces régimes étaient moins efficaces que CHOP d'où la préférence du régime CHOP.

Le régime de l'ACVBP (doxorubicine, cyclophosphamide, vindésine, bléomycine et prednisone) a, lui, donné de meilleurs résultats que le régime CHOP dans une étude rétrospective incluant des patients atteints de PTCL (Tilly et al., 2003). La survie à 5 ans était significativement plus importante pour les patients traités par ACVBP que pour les patients traités par CHOP (respectivement 46% et à 38%) et le taux de réponse complète était de 58% dans le groupe ACVBP et de 56% dans le groupe CHOP.

Tableau 12 : Molécules antitumorales utilisées en chimiothérapie.

Molécules antitumorales	Mode d'action
Cyclophosphamide	Agent alkylant, provoque des lésions au niveau de l'ADN en formant des ponts inter-chaîne
Doxorubicine	S'intercale entre les brins d'ADN
Vincristine	Poison du fuseau mitotique, inhibe la polymérisation de celui-ci en se fixant à la tubuline

Prednisone	Corticoïde, effet anti-inflammatoire
Romidepsine	Inhibiteur des histones désacétylases (HDAC), qui <i>via</i> le remodelage de la chromatine, induit l'arrêt de la croissance et de la différenciation cellulaire puis une apoptose
Etoposide	Inhibe l'entrée en mitose (prophase) des cellules tumorales, par action sur la topoisomérase II, qui permet la « détorsade » des deux brins d'ADN. Il en résulte une cassure des deux brins
Vindésine	Entraîne un arrêt en métaphase des cellules en division mitotique
Bléomycine	S'intercale avec l'ADN donnant lieu à des ruptures
Bortézomib	Inhibiteur du protéasome (nécessaire à la survie de toutes les cellules, y compris les cellules tumorales qui sont encore plus sensibles que les cellules saines à son inhibition)
Cisplatine	Empêche la croissance des cellules cancéreuses en interférant avec l'ADN
Gemcitabine	Inhibition complète de la synthèse de l'ADN, ce qui conduit à l'apoptose cellulaire tumorale
Épirubicine	Se lie à l'ADN et inhibe l'action des polymérases des acides nucléiques
Méthylprednisolone	Corticoïde, effet anti-inflammatoire

En tenant compte du microenvironnement unique dans les LTAI, des essais cliniques ont tenté de cibler la vascularisation anormale due à la surexpression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et la prolifération des cellules B due à la réactivation EBV.

Ces essais incluent le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF, qui a été combiné avec CHOP dans une étude de phase 2 (Ganjoo et al., 2014) : 49% des patients ont présenté une réponse complète et 41% une réponse partielle.

Un autre essai clinique ayant évalué l'ajout de rituximab (un anticorps monoclonal anti-CD20) à la polychimiothérapie classique CHOP n'a pas montré de réels bénéfices pour les patients recevant ce traitement (Delfau-Larue et al., 2012). Par ailleurs, une étude postérieure a démontré que ce régime présente une toxicité cardiaque significative (Advani et al., 2012).

L'alemtuzumab, un anticorps monoclonal anti-CD52, a également été combiné avec CHOP (A-CHOP). Cet anticorps, contrairement au rituximab, a la caractéristique de pouvoir cibler les cellules T et B qui expriment CD52. Deux études de phase 2 sur les PTCL, y compris des cas de lymphome LTAI, ont été menées. La première étude a été réalisée en Europe sur 25 patients dont 6 étaient atteints de LTAI (Gallamini et al., 2007). Ces derniers ont tous répondu au traitement. Par contre, des complications infectieuses sont survenues. Dans le deuxième essai avec A-CHOP, 16 patients sur 20 ont répondu au traitement avec un taux de réponse complète de 65% (Kim et al., 2007). Deux des 3 patients (66%) atteints de LTAI ont répondu. Le traitement A-CHOP semble avoir un potentiel pour élever la réponse complète comparativement à CHOP seul.

D'autre part, la greffe des cellules souches hématopoïétiques pourrait être une option de traitement chez les patients les plus jeunes atteints de LTAI (Lindahl et al., 2001; Schetelig et al., 2003). En effet, une grande analyse rétrospective du groupe Européen pour la transfusion sanguine et la greffe de moelle osseuse (*EBMT : European group for Blood and Marrow Transplantation*), dans laquelle le LTAI représentait 56% des cas, a révélé un taux de réponse de 76% et une survie globale à 5 ans chez 44% des PTCL (Kyriakou et al., 2008). Ce qui montre la faisabilité et l'efficacité de ce traitement et pourrait expliquer la raison du recours à la greffe dans les cas de rechute chez les personnes jeunes.

V. Objectifs du travail

Chapitre V. Objectifs du travail

L'EBV est déjà décrit comme associé à plusieurs pathologies. Il est toujours trouvé dans les cellules B des LTAI et occasionnellement dans les cellules néoplasiques T. L'EBV est-il un élément précipitant la maladie ou un simple passager ? Les théories sur cette question sont diverses. A l'heure actuelle, la plupart des auteurs s'accordent pour dire que l'EBV ne serait pas impliqué dans le LTAI. Pour eux, la présence virale seulement dans une sous-population de cellules (cellules B) et du nombre de cellules B EBV positives très variable d'un patient à l'autre, suggèrent que l'infection est secondaire à la transformation (Carbone et al., 2012). Certains avancent l'hypothèse d'une réactivation virale due à un défaut de surveillance des cellules T. L'évolution vers un lymphome B EBV positif, d'aspect d'un lymphome post-transplantation, a été rarement rapportée (Yang et al., 2012). Mais on peut constater que peu d'études ont été faites sur le sujet.

Dans un travail auquel j'ai participé, notre laboratoire s'est précédemment intéressé au gène *LMP-1* du virus EBV de patients atteints de lymphome NK/T et a montré la présence d'une délétion de 30 pb sur ce gène chez 46,1% des patients, mutation associée à des substitutions pouvant modifier le comportement protéique. Cette délétion était associée à une plus mauvaise évolution du lymphome NK/T et était décrite comme particulièrement oncogène (Halabi et al., 2016).

Ces résultats intéressants nous ont amenés à penser que le virus peut aussi présenter des modifications sur d'autres parties de son génome et que ces modifications pourraient induire une réponse cellulaire et/ou un comportement viral différents.

Dans le contexte que nous venons de développer, il nous a paru intéressant :

- D'examiner la séquence virale complète de l'EBV au sein des biopsies lymphomateuses de patients atteints de LTAI,
- De comparer cette séquence aux résultats obtenus pour d'autres lymphomes (B et NK/T) ainsi qu'aux séquences publiées,

→ De mettre en évidence des variations génomiques (insertions, délétions et SNP) déjà décrites comme impliquées dans les lymphomes B et NK/T. Si elles sont trouvées, ceci servira à apporter des précisions sur la physiopathologie du LTAI comparativement aux autres lymphomes. Certains virus, plus oncogènes, pourraient être trouvés plus spécifiquement dans une pathologie donnée.

→ De voir s'il existe de nouvelles mutations récurrentes dans les LTAI afin de déterminer si un virus particulier est associé à cette pathologie,

→ D'analyser profondément les mutations au niveau des gènes de latence, vu le rôle essentiel de ces gènes dans l'oncogenèse et de voir si l'EBV a un profil oncogénique dans les LTAI,

→ Et enfin, de chercher la clonalité du virus EBV dans les LTAI, la corrélérer avec la clonalité B et T et déterminer si l'EBV pourrait jouer un rôle causal dans cette pathologie.

Ces connaissances permettront de mieux cerner les mécanismes de la lymphomagenèse et d'envisager à terme, une approche thérapeutique.

Matériels et Méthodes

Chapitre VI. Matériels et Méthodes

IV.1. Matériels

VI.1.1. Lignées cellulaires

Le travail a été initialement commencé par la mise au point sur des lignées lymphocytaires connues, porteuses du virus et donnant déjà des indications intéressantes. Ces lignées nous permettent de valider les techniques et de ne pas sacrifier de matériel humain.

Nous disposons au laboratoire de diverses lignées.

A) Lignée B95.8

Il s'agit d'une lignée lymphoblastoïde de singe marmoset, dérivant d'un virus isolé chez un patient ayant eu une mononucléose infectieuse acquise par transfusion. Ce virus est immortalisant et présente une délétion de 11,8 kb (Skare et al., 1982) supprimant notamment une *OriLyt* et une grande partie de miARN *BART*. Il exprime les gènes latents et lytiques à la fois de façon constitutive et concomitante. Cette lignée est faiblement productrice (de l'ordre de 3 %) mais peut être induite notamment par des agents chimiques.

B) Lignées lymphoïdes issues de lymphomes de Burkitt (BL) EBV positifs

Nous avons choisi un panel de lignées cellulaires BL EBV positives avec des caractéristiques différentes.

Raji : les cellules Raji comportent 50 copies d'EBV par cellule (Marshall et al., 2000) avec deux principales délétions : une séquence de 3,5 kb couvrant l'ensemble du gène *EBNA-3C*, indispensable pour l'immortalisation des cellules B (Maunders et al., 1994), le gène *BZLF2* et la séquence de 2,9 kb à l'extrémité droite du fragment de restriction A (*BARF1*, *BALF1* et surtout *BALF2*) (Decaussin et al., 1995).

Ce qui rend le virus défectif et ne peut aboutir à un cycle réplcatif complet qu'en présence d'un autre virus EBV non défectif qui apporte en *trans* les gènes manquants. L'EBV présent est de type 1.

Namalwa : les cellules Namalwa, quant à elles, contiennent 2 copies du génome viral sous forme intégrée et ne sont pas productrices (Klein et al., 1972). L'EBV présent est de type 1.

P3HR1 et sa lignée progénitrice Jijoye appartiennent au type 2. La lignée P3HR1 est délétée de la séquence entre 33 355 et 40 163 pb contenant le gène *EBNA2* d'où le caractère non transformant du virus.

Plusieurs caractéristiques permettent également de différencier les lignées choisies.

En effet, les cellules infectées par l'EBV types 1 et 2 présentent différents potentiels de transformation et de croissance cellulaires (Rickinson et al., 1987).

Toutes ces lignées BL, à l'exception de Namalwa, hébergent le virus sous une forme épisomique. Dans les cellules Namalwa, le génome EBV est intégré dans le chromosome humain (Henderson et al., 1983).

En outre, Jijoye et P3HR1 sont des lignées cellulaires productrices d'EBV tandis que les cellules de Raji et Namalwa ne le sont pas.

Enfin, bien que les cellules BL présentent initialement un programme de latence I, certaines lignées cellulaires BL, comme par exemple Raji, peuvent passer à un programme de latence III après culture *in vitro*, alors que d'autres, comme Namalwa, ne le font pas.

C) Lignées issues des lymphomes NK/T

Nous avons utilisé deux lignées cellulaires humaines NK/T EBV positives : la lignée SNK6 et la lignée Mec04 qui ne sont pas beaucoup décrites dans la littérature.

VI.1.2. Biopsies congelées et paraffinées de patients

40 adénopathies EBV positives de 40 patients dont le rapport homme/femme était de 0,46 et la médiane d'âge de 63 +/- 16,37 ans.

VI.1.3. Echantillons de sérum

15 échantillons de sérum ont été récupérés au début de l'étude. Cependant, un seul a été gardé après le séquençage pour les analyses bioinformatiques. Il appartient à un jeune garçon (13 ans) ayant présenté une mononucléose infectieuse symptomatique.

VI.1.4. Contrôle

L'échantillon contrôle appartient à une femme de 72 ans ayant une adénopathie inflammatoire réactionnelle EBV positive.

Les numéros des patients, les types de pathologies associées, le sexe, l'âge, l'organe infiltré ainsi que d'autres informations sont tous résumés dans l'annexe 1.

VI.2. Méthodes

VI.2.1. Culture cellulaire des lignées

Les lignées B sont cultivées dans du RPMI-1640 avec glutamax (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (Invitrogen) et des antibiotiques (100 U/mL de pénicilline/ 100 µg/mL de streptomycine) (Gibco). Les cellules ont été cultivées à 37° C et dans une atmosphère humidifiée à 5 % CO₂.

En ce qui concerne les lignées NK/ T, elles ont été cultivées de la même manière mais en présence de 100 U/mL d'interleukine-2 (IL-2).

VI.2.2. Coupes des biopsies paraffinées ou congelées

Les coupes des biopsies paraffinées sont réalisées dans un microtome.

Quant aux tissus congelés, les coupes sont faites dans un cryostat, microtome localisé dans une enceinte réfrigérée à -23 °C, après avoir enrobés les blocs congelés dans un produit durcissant, le Tissue Tek OCT, *Optimal Cutting Temperature*, (Sakura). Il s'agit d'un composé adéquat pour préserver l'ultrastructure cellulaire (histologie) aussi bien que les acides nucléiques.

Cinq à dix coupes de 10 µm chacune ont été utilisées pour faire les extractions.

VI.2.3. Extraction

Extraction de l'ADN total des lignées : l'ADN des lignées cellulaires est extrait en utilisant le kit *DNeasy Blood and Tissue kit* selon le protocole du fabricant (Qiagen, Hilden, Allemagne).

Les culots cellulaires (correspondant à environ 10⁶ cellules) sont d'abord repris dans 200 µL de PBS (*Phosphate Buffered Saline*) et sont lysés en présence de protéinase K. Ensuite, le

lysate est chargé sur la colonne. Durant la centrifugation, l'ADN, grâce à sa charge négative, se lie sélectivement à la membrane de silice chargée positivement et tous les contaminants la traversent.

L'ADN lié sur la membrane subit deux étapes de lavage et est ensuite élué en utilisant de l'eau *RNase free*.

Extraction de l'ADN total des biopsies congelées : l'ADN des coupes congelées est extrait en utilisant le même kit et de la même manière en partant de 6 coupes de 10 micromètres chacune.

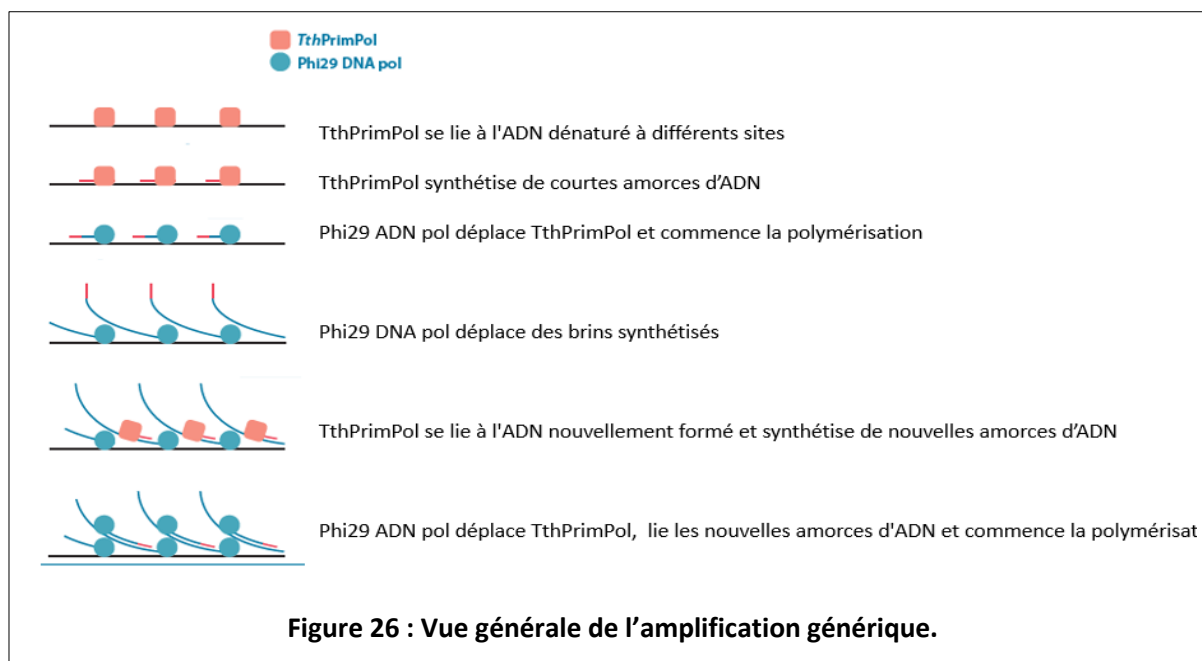
Extraction de l'ADN total des biopsies paraffinées : l'extraction à partir des coupes paraffinées a été faite en utilisant le kit *QIAamp DNA FFPE extraction kit* (Qiagen, Hilden, Allemagne). C'est le même principe que le *DNeasy Blood and Tissue kit* mais avec une étape supplémentaire au début de l'expérience. Elle consiste à placer immédiatement les sections paraffinées dans un tube de 1,5 ou 2 mL, d'ajouter 1 mL de xylène et de vortexer vigoureusement pendant 10 s pour dissoudre la paraffine. La centrifugation à pleine vitesse (14000 rpm) pendant 2 min à température ambiante (TA) permet de récupérer le culot. Ensuite, l'ajout de 1 mL d'éthanol (96-100%) et la centrifugation à pleine vitesse pendant 2 min à TA permettent d'extraire le xylène résiduel de l'échantillon. Après avoir séché le culot, le tampon de lyse et la protéinase K sont ajoutés et la suite du protocole est identique à ce qui a déjà été décrit pour les biopsies congelées.

Le nombre de coupes utilisé par biopsie était de 5 à 10 coupes de 10 micromètres chacune, selon la taille de l'empreinte sur la paraffine.

Extraction de l'ADN des sérums : l'extraction a été réalisée à l'aide du système *EasyMAG NucliSENS* (BioMérieux).

Amplification de l'ADN sérique a été faite en utilisant le kit *TruePrime™ WGA* (Ozyme) selon les instructions du fabricant (**Figure 26**). Cette technique est basée sur l'amplification à déplacement multiple et utilise deux enzymes : l'ADN primase récemment découverte TthPrimPol et l'ADN polymérase Phi29 hautement processive et possédant une haute-fidélité pour amplifier l'ADN génomique. La forte capacité de déplacement de la Phi29 polymérase sur les brins d'ADN permet à la TthPrimPol de générer de nouvelles amorces sur

les brins étendus par Phi29 ; il en résulte une amplification exponentielle isotherme de l'ADN.



VI.2.4. Dosage au Nanodrop

Pour chaque échantillon, l'absorbance relative de l'ADN et des protéines a été mesurée au spectrophotomètre à 260 nm et 280 nm en utilisant un Nano Drop® ND-1000 Spectrophotometer. Le dosage à 260 nm a par ailleurs permis de calculer la concentration en ADN de chaque échantillon. Les échantillons ont tous montré un rapport DO 260/DO 280 entre 1,7 et 2 et les analyses d'absorbance ont présenté un pic symétrique à 260 nm confirmant une pureté élevée.

VI.2.5. Clonage

L'amplification d'un fragment du gène BMRF-1 de l'EBV a été réalisée par une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), en utilisant l'amorce sens CCGGCCTGAATTTGTTAAGC et l'amorce antisens CTTGGGCATCAACAGCACC. La réaction de PCR a été développée sous un volume de 50 µL en utilisant le mélange réactionnel suivant (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Mélange réactionnel et conditions d'amplification pour la PCR.

	Mix
10X Ex Taq Buffer	5 µL
dNTP Mixture	200 µM de chaque
Amorce sens	0.4 µM
Amorce anti-sens	0.4 µM
Enzyme TakaRa Ex Taq	1 unité
ADN extrait de B95-8	250 ng
Eau ultra pure	qsp 50 µL

Les conditions d'amplifications sont représentées dans le tableau suivant :

	Température	Temps	30 Cycles
Dénaturation	98°C	10sec	
Hybridation des amorces	56°C	30sec	
Elongation	72°C	1 min	

A la fin de cette PCR, de la Taq ADN polymérase (Qiagen, Hilden, Allemagne) a été ajoutée au mix (1 unité par tube), puis le tube de PCR a été remis dans le thermocycleur à 72°C pendant 9 min afin d'ajouter une queue poly-A au fragment déjà amplifié (sans amplification).

Le produit de PCR obtenu a ensuite été purifié à l'aide du *kit QIAquick PCR*® (Qiagen) en suivant les recommandations du fabricant, afin de pouvoir effectuer le clonage.

Les clonages ont été effectués à l'aide du *kit TOPO TA Cloning*® (Invitrogen). Le kit contient tous les éléments nécessaires pour le clonage : le vecteur pCR 2.1, la ligase et son tampon de ligation, de l'eau distillée DNase free et du milieu SOC.

Le plasmide utilisé est le pCR 2.1 double brin. Ce dernier a la particularité d'être sous forme linéaire et possède à ses extrémités 3' des résidus déoxythymidine lui permettant d'être plus particulièrement adapté pour l'insertion et la ligation d'inserts comportant à leurs extrémités des résidus désoxyadénosine. Ce plasmide possède également un marqueur

de sélection, le gène de résistance à l'ampicilline, permettant la sélection des bactéries portant le plasmide. Il possède aussi un gène rapporteur, le gène *Lac-Z*, au sein duquel se trouve le site d'insertion. Une fois ce gène exprimé, la β -galactosidase produite catalyse l'hydrolyse du substrat X-Gal (Sigma), ajouté au milieu, ce qui conduit à la formation de colonies bleues. L'intégration de l'insert inhibe la synthèse de la β -galactosidase fonctionnelle et donc l'hydrolyse de X-gal, ce qui donne des colonies blanches. Chaque colonie blanche possède donc un insert dans le gène *Lac-Z*.

Le clonage s'effectue dans des bactéries *Escherichia coli* Top 10® (Invitrogen). Ces dernières sont directement compétentes et ont la particularité de ne pas exprimer de répresseur de *Lac-Z*. La ligation des inserts a été réalisée selon le rapport insert vecteur 3/1, rapport qui a été retenu comme donnant les meilleurs résultats après plusieurs essais. La transformation s'effectue par un choc thermique de 30 sec à 42°C, afin de fragiliser les parois bactériennes dans le but de faire pénétrer les plasmides, suivi d'un maintien à 4°C pendant 30 min.

Les bactéries ont alors été mises en culture après qu'on ait ajouté 250 μ L de milieu S.O.C. (2 % Tryptone, 0.5 % d'extrait de levure, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) qui est un milieu riche pour les bactéries *E. coli*. Puis les tubes ont été bouchés hermétiquement et ont été agités horizontalement à une vitesse de 35 g à 37°C pendant 1 heure. Les suspensions bactériennes ont été étalées stérilement sur deux boîtes de Pétri coulées et séchées au préalable (10 mL milieu Brain Heart Infusion (BHI)-agar + ampicilline 50 μ g/mL + X-Gal à 40 mg/mL). Les boîtes ont été incubées une nuit à 37°C. Des colonies bleues et des colonies blanches sont apparues sur les boîtes de Pétri ; toutes les colonies qui ont poussé étaient résistantes à l'ampicilline, car avaient intégré le plasmide pCR®2.1-TOPO® qui possède un gène responsable de la résistance à l'ampicilline (Sigma). Les colonies blanches des bactéries qui poussaient sur les boîtes de Pétri, ont été repiquées à raison d'une colonie par tube, dans des bouillons Brain Heart Infusion (BHI) de 10mL, un milieu très nutritif servant à la croissance des bactéries *E. coli*, et contenant 50 μ g/mL d'ampicilline. Les tubes ont été incubés à 37°C sous agitation en position verticale à une vitesse de 60 g pendant une nuit.

Extraction Miniprep : afin d'obtenir de l'ADN purifié, une extraction de l'ADN plasmidique des clones sélectionnés comme positifs a ensuite été réalisée. L'extraction Miniprep de

l'ADN plasmidique a été faite avec le *Kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System* (Promega-Madison-Etats-Unis).

Gamme de dilution : des dilutions en série de l'ADN plasmidique ont été réalisées en vue d'obtenir la gamme d'étalonnage qui va servir lors de l'analyse quantitative de l'EBV.

VI.2.6. PCR quantitative de l'EBV

La charge virale de l'EBV a été déterminée par le dosage TaqMan. Les séquences d'amorces ainsi que celle de la sonde utilisée pour l'amplification du gène viral *BMRF-1* sont désignées en utilisant *primer BLAST* et étaient respectivement : BMRF1 sens, 5'-CCGGCCTGAATTTGTAAAGC-3', BMRF1as (anti-sens), 5'-CTTGGGCATCAACAGCACC-3', BMRF1p (sonde), 5'-AATCATCTGCTCGTTCCTCAGCC-3'. 100 ng d'ADN de chaque échantillon ont été analysés en double en utilisant le masterMix de Roche sur un Rotor-Gene Q (Qiagen). Le programme utilisé est : 95°C pendant 10 minutes, suivi par 45 cycles de 95°C pendant 30 secondes et 60°C pendant 1 minute. La quantification a été faite comparativement aux standards obtenus par clonage décrit dans l'étape précédente (VI.2.5).

VI.2.7. Design des sondes

Les génomes du prototype de l'EBV type 1 (NC_007605) et celui de type 2 (NC_009334) ont été utilisés comme références pour fabriquer des sondes EBV par la plateforme (*Matt Rodesch* - Madison, États-Unis). Ces sondes sont constituées de 100 à 120 bases chacune. Leur chevauchement est estimé pour couvrir presque 99.7 % du génome EBV1 et 99.9 % de celui d'EBV2 de sorte que chaque base est couverte au moins 5 fois.



En outre, elles étaient générées de façon à ce qu'elles ne s'accrochent pas au génome humain. Et ceci en utilisant des filtres fournis par un algorithme qui s'appelle SSAHA qui couvrent plus de 70 % du génome humain. La grande majorité des sondes sont uniques,

avec quelques sondes qui possèdent un degré d'homologie multi-locus plus élevé pour augmenter la couverture dans toutes les régions.

VI.2.8. Dosage Qubit

L'ADN extrait des échantillons a été redosé par Qubit® 2.0 Fluorometric Quantitation, Life Technologies (Invitrogen) car après avoir comparé les deux méthodes de quantification largement utilisées (Thermo Scientific Nanodrop 2000 Spectrophotometer et Life Technologies Qubit® 2.0 Fluorometer), nous avons constaté que le spectrophotomètre a surestimé la teneur en ADN de nos échantillons par rapport à la technique fluorométrique, en détectant d'autres nucléotides, protéines et contaminants.

VI.2.9. Synthèse de bibliothèques pour le séquençage *Illumina*

L'expérience globale a été menée selon le protocole de *NimbleGen seqcap EZ library SR* de Roche.

Sonication : plusieurs essais de sonication sur le Bioruptor® Pico (Diagenode) ont été faits pour obtenir des fragments de 200 pb et ceci en partant de 2 µg d'ADN de chaque échantillon dans 100 µL. Le nombre de cycle final utilisé était de 13 cycles pour les lignées et les tissus congelés et de 15 cycles pour les tissus paraffinés. Chaque cycle correspond à 30 secondes de cassure et 30 secondes de repos. Une centrifugation (courte) était nécessaire entre les cycles pour que la cassure soit homogène.

VI.2.10. Dosage au bioanalyseur

L'ADN soniqué a été monitoré sur une puce DNA High sensitivity (Bioanalyzer, Agilent) ayant comme objectif d'identifier la taille moyenne des fragments (**Figure 27**).

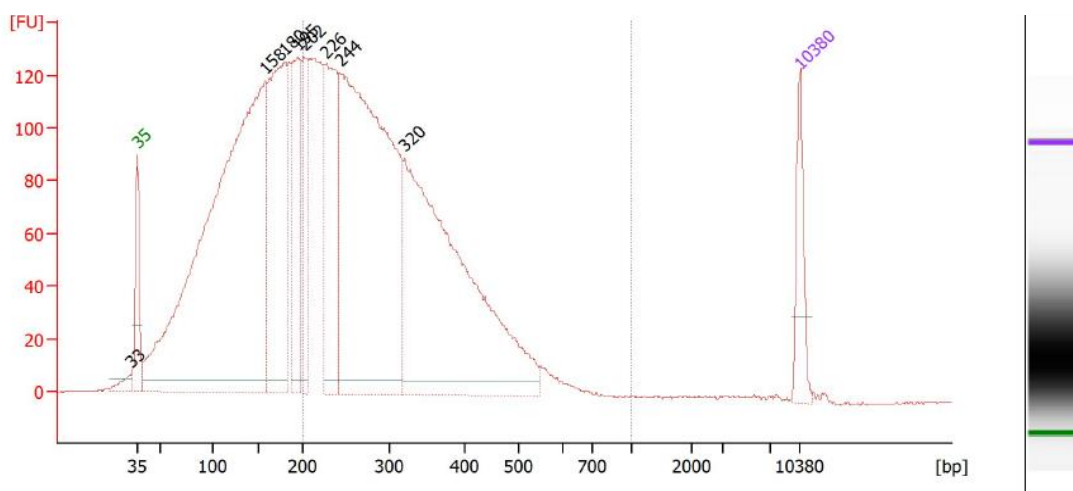


Figure 27 : Vérification de la taille des fragments par Agilent Bioanalyzer. L'axe des abscisses indique les tailles des fragments d'un marqueur de taille, allant de 35 jusqu'au 10 380 pb. Les hauteurs des pics reflètent les concentrations des fragments. Il faut noter que les 2 pics correspondant aux fragments 35 et 10 380 pb sont toujours présents quel que soit le résultat. Le fragment obtenu est de 200 bp, avec une grande concentration (pic important) ce qui vérifie ce que nous attendons.

Réparation des extrémités des fragments, ajout de la queue polyA et ligation des adaptateurs et des index

Les fragments obtenus ont été réparés « End-repaired » en vue d'être terminés à leur extrémité 5' par un phosphate et d'obtenir des bouts francs après la cassure. La réaction est effectuée dans un tube à PCR à 20°C pendant 30 minutes.

Les fragments ont également subi l'addition d'une queue "polyA" à l'extrémité 3'. La réaction est effectuée à 20 °C pendant 15 minutes. Ensuite, la ligation des adaptateurs et des index a été mise en place. Les adaptateurs servent à l'amplification dans les étapes suivantes. Ils fournissent des amorces pour les PCR et sont complémentaires aux queues poly A. Les index servent au processus de multiplexage qui permet de séquencer plusieurs échantillons sur une même puce. Après la ligation, les ADN sont amplifiés par PCR (également connu sous le nom d'amplification pré-capture) pendant 8 cycles (15 secondes à +98°C /30 secondes à +60°C /30 secondes à +72°C). Un microlitre de fragments ligaturés a été utilisé pour vérifier la taille obtenue par Agilent 2100 Bioanalyseur et 2 microlitres pour la quantification Qubit. La taille des fragments attendue à cette étape était d'environ 300 pb.

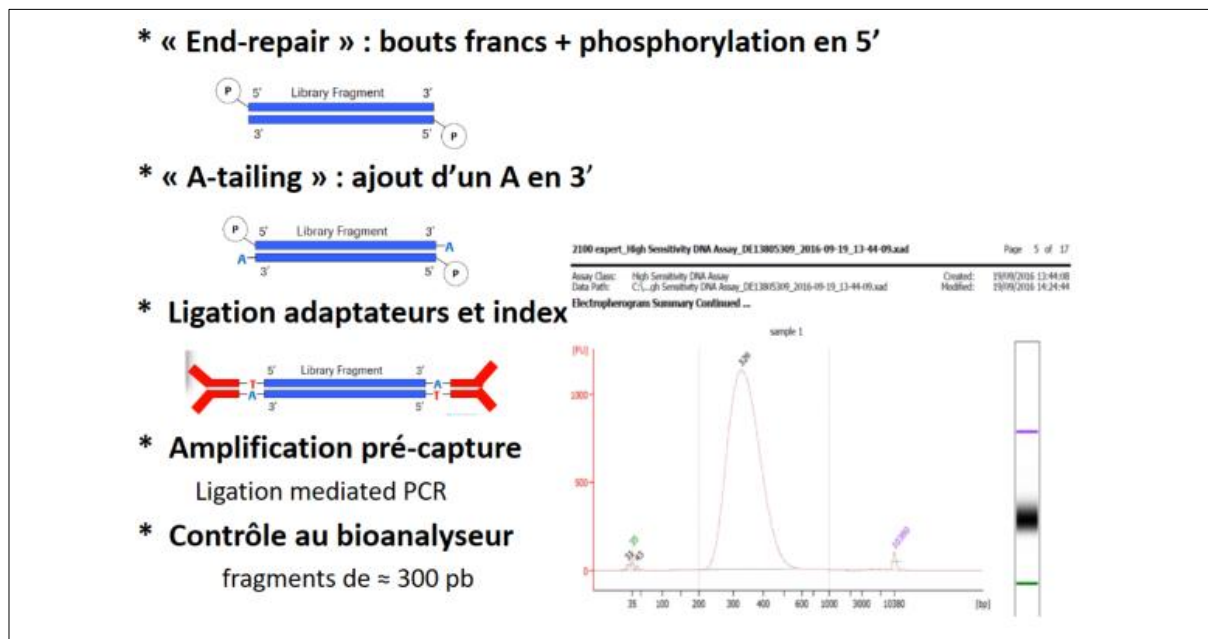
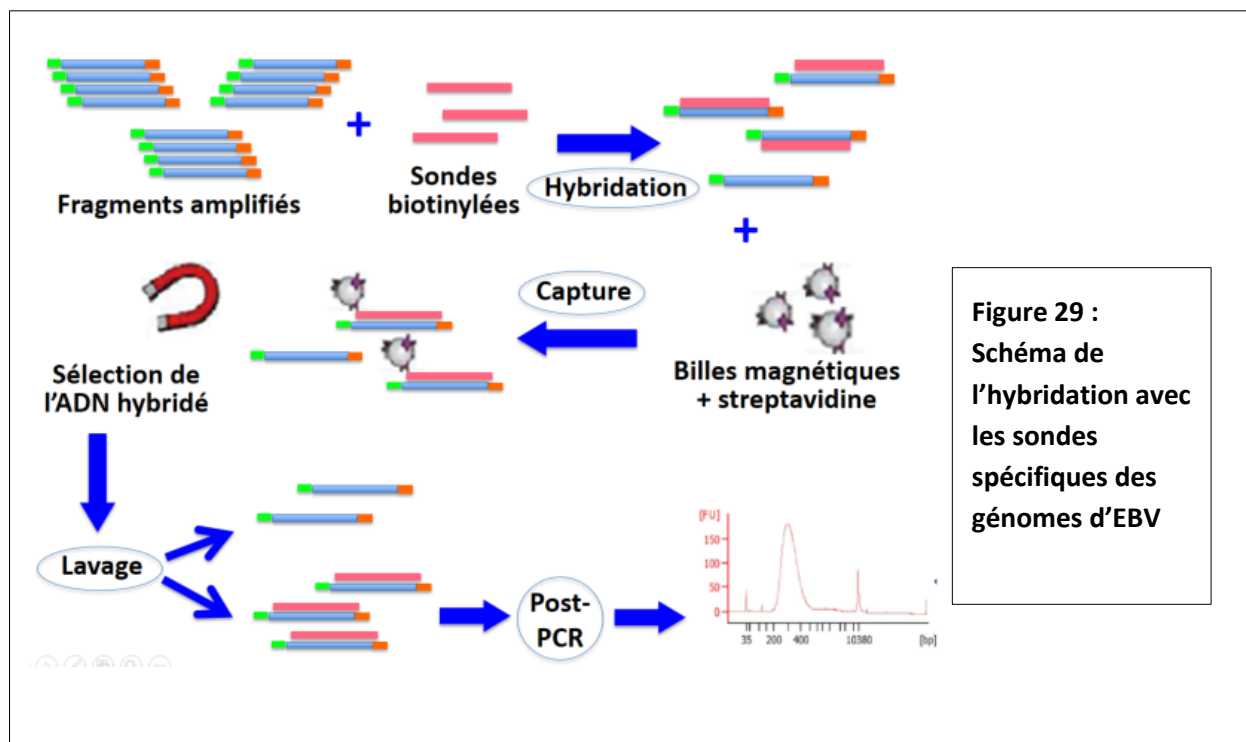


Figure 28 : Premières étapes de la synthèse des librairies.

Ensuite, les librairies obtenues ont été regroupées en quantités équimolaires pour obtenir un total de 1 microgramme d'ADN et ont été hybridées avec des sondes EBV biotinylées à 47°C pendant 24 heures. Les fragments hybridés contenant les gènes cibles ont été adsorbés sur des billes magnétiques portant de la streptavidine et les fragments d'ADN non accrochés ont été éliminés par lavage.

Après le lavage, l'ADN hybridé a été élué à partir des billes et enrichi par PCR (PCR intermédiaire), le nombre de cycles était de 5.



Sachant que le lymphome LTAI pourrait contenir un faible nombre de copies du virus EBV, une deuxième capture, un lavage et une amplification de 14 cycles de PCR (PCR post-capture) ont été effectués pour augmenter le rendement d'hybridation.

Les bibliothèques finales ont été quantifiées et séquencées sur *Illumina* (séquençage par paire ou paired end).

Selon la charge virale avant la synthèse de la bibliothèque, deux plates-formes de séquençage *Illumina* ont été utilisées.

Dans le cas des échantillons avec une charge virale supérieure à 100 000 copies/microgramme d'ADN, le séquençage a été réalisé sur *Illumina MiSeq* (2 × 250 pb de séquençage par paire) (*Illumina*, ICM, Paris)

Pour les autres échantillons (ayant moins de 100 000 copies/microgramme d'ADN), on a utilisé l'*Illumina NextSeq* (2 X 75 pb de séquençage par paire) (*Illumina*, ICM, Paris) pour le séquençage.

VI.2.11. Analyses bio-informatiques

Les fastq générées après le séquençage ont d'abord été démultiplexées en des échantillons individuels à l'aide du *MiSeq reporter software* (*Illumina*, Inc.). La suppression des adaptateurs aux extrémités 3'et 5' a été effectuée en utilisant l'outil *Cutadapt* mis en œuvre dans le programme *Trim Galore*. Ensuite, les lectures (*reads*) ont été filtrées à un score de Phred égal à 25 pour éliminer les bases de faible qualité. L'outil utilisé était *Trimmomatic*.

Les lectures de haute qualité de chaque échantillon ont ensuite été alignées contre le génome humain (NCBI build 37, HG19). Celles qui étaient parfaitement appariées sur ce dernier ont été écartées. Les lectures restantes étaient réservées et alignées contre chacun des deux génomes d'EBV de référence (NC_007605 et NC_009334). L'alignement dans ces deux étapes a été effectué en utilisant le programme *Bowtie2* avec les paramètres par défaut, ce qui génère des fichiers BAM.

Typage : les génomes des deux types d'EBV (EBV 1 et EBV 2) diffèrent notamment au niveau des gènes EBNA-2 et EBNA-3. Cette différence permet de distinguer les grandes régions exclusives de l'un ou de l'autre type d'EBV. Pour cela, on a aligné les BAM obtenus pour

chaque échantillon contre les génomes de référence d'EBV-1 et -2 (NC_007605 pour le type 1 et NC_009334 pour le type 2) dans IGV (*Integrative Genomics Viewer*). On a comparé les régions EBNA-2 et EBNA-3A-3B-3C. Ensuite on a calculé le rapport : reads alignés contre EBV1/ reads alignés contre EBV2 dans ces régions.

Toutes les lectures appariées au génome d'EBV ont ensuite été soumises à un processus de filtrage pour éliminer les éventuels doublons résultants des PCR. Le pourcentage de couverture virale a été évalué en utilisant l'outil *Plot Coverage*.

Assemblage *de novo* : les paires de lecture obtenues à partir des étapes précédentes ont été assemblées à l'aide du script *Velvet* en fonction de l'algorithme graphique de Bruijin. Ce script a été inclus dans VirAmp (un pipeline d'assemblage de génome viral) (Wan et al., 2015). Ce pipeline combine les outils et les techniques déjà existants, pour assembler, échafauder et analyser les données de séquençage. Les *contigs* générés par *Velvet* ont été alignés et orientés contre les génomes des références (NC_007605 pour type 1 ou NC_009334 pour type 2) et le remplissage des espaces (*gaps*) a été effectué avec ce même pipeline.

Détection des mutations : cette étape a été faite en créant tout d'abord un pileup : état des lieux de chaque base tout au long du génome viral séquencé. D'une autre manière, il s'agit de préciser la nature du nucléotide trouvé à chaque position. Ensuite, les mutations (SNP synonymes et non synonymes, insertions et délétions) ont été détectées par l'outil VarScan (dans Sam Tools) en comparant les bases trouvées avec les références d'EBV.

VI.2.12. Séquençage Sanger

Parallèlement au séquençage Illumina, nous avons choisi 5 gènes viraux bien définis : 3 lytiques (*BMRF1*, *BORF1* et *BFRF1*) et 2 latents (*LMP-1* et *EBNA-3A*). Ces gènes ont été séquencés par Sanger dans les 7 lignées pour valider la technique.

En effet, ces gènes ont tout d'abord été amplifiés en utilisant des amorces spécifiques, et selon le protocole d'amplification décrit dans la partie (V.2.6). Une PCR nichée a été faite également en utilisant des amorces plus internes dans les gènes et avec les mêmes conditions de la première PCR. Les produits de PCR purifiés ont été séquencés en utilisant le

BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, Etats Unis) sur un séquenceur d'ADN *ABI prism 3130xl Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

La réaction de séquençage a été effectuée sous un volume de 20 µL. Le milieu réactionnel était composé de l'ADN à séquencer (3 µL), de 3 µL de « Terminator ready reaction mix ». Ce mixte est composé de Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués par un composé fluorescent appelé « dye », du tampon de l'enzyme 1x soit 200 mM Tris pH9, 5 mM MgCl₂, d'une amorce à concentration de 0.7 µM, et d'eau ultra pure sans nucléase qsp 20 µL.

L'élongation des amorces a été effectuée dans un thermocycleur selon les conditions suivantes : 96°C pendant 1 min, 25 cycles à 96°C pendant 10 sec, puis 50°C pendant 5 sec (hybridation) et élongation de 4 min à 60°C.

Préparation des colonnes : la résine *Sephadex* en poudre a été déposée dans les puits d'une plaque filtrante et celle-ci était placée sur une plaque de récupération d'eau. Trois cents microlitres d'eau PPI (Pour Préparation Injectable) ont été ajoutés dans chaque puits. Puis la plaque a été fermée et placée à 4°C pendant au moins 30 minutes. Après l'incubation, elle a été centrifugée pendant 3 min à 910 g.

Purification : une fois les colonnes prêtes, chaque produit de séquençage (ou de PCR) a été déposé délicatement au centre de chaque mini-colonne, puis centrifugé pendant 3 min à 910g. Les filtrats résultants contiennent les produits de PCR de séquence. Les plaques prêtes ont ensuite été chargées dans le séquenceur de l'Unité de Séquençage du CHU de Limoges.

Alignements et comparaisons des séquences

Finalement, pour chaque lignée, les résultats obtenus avec les différentes amorces ont été alignés à l'aide du logiciel SeqScape version 2.5 (Applied BioSystems) avec une référence pour former une séquence consensuelle. Cette séquence consensuelle a été retravaillée pour lever toutes les ambiguïtés.

VI.2.13. Clonalité B et T

Les gènes codant les immunoglobulines sont répartis en trois complexes différents (Schroeder and Cavacini, 2010) : le locus *Igk* sur le chromosome 2, le locus *Igλ* sur le chromosome 22 codant les chaînes légères et le locus *IgH* sur le chromosome 14 codant la chaîne lourde.

La clonalité des cellules B a été évaluée après l'amplification des régions V-D-J (*Variable, Diversité et Jonction*) de la chaîne lourde (H, heavy) des cellules B en utilisant l'amorce IGHJ et les familles des amorces IGHV (FR1, FR2 et FR3) ainsi que celles de la chaîne légère en utilisant l'amorce IGKJ et les familles des amorces IGKV (voir annexe 3). La séquence des amorces ainsi que le protocole d'amplification étaient exactement ceux décrits par van Dongen (van Dongen et al., 2003).

La formation du locus TCR est semblable au phénomène conduisant à la formation des récepteurs des cellules B et des anticorps. La chaîne alpha du TCR est générée par une recombinaison VJ, tandis que la chaîne bêta subit une recombinaison VDJ. De même, la chaîne gamma est issue d'une recombinaison VJ et la chaîne delta d'une recombinaison VDJ.

La clonalité du TCR a été déterminée par l'amplification de gène *TCRβ* et *TCRγ* en utilisant des amorces de famille Vβ ou Dβ et une famille des amorces Jβ pour le premier gène. Pour le second, ce sont les familles des amorces Vy et Jy qui étaient utilisées (Annexe 4). Le protocole standard pour la PCR de BIOMED-2 est récapitulé dans les 2 tableaux suivants :

Tableau 14 : Protocole standard de BIOMED-2 pour l'amplification des chaînes des TCR et BCR.

Tampon : ABI Buffer II ou ABI Gold Buffer (Applied Biosystems)	45 microlitres
ADN	100 ng
Amorce	10 pmol de chacune
dNTP	Concentration finale 200 mM
Enzyme : AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)	1U (2 U dans des tubes avec beaucoup d'amorces >15)
Eau	Qsp 50 microlitres

Les conditions d'amplification étaient respectivement les suivantes :

Activation de l'enzyme (95°C)	7 min	
Dénaturation	45 s	35 cycles
Hybridation (60 °C)	≥45 s	
Extension	1.30 min	
Extension finale	≥10 min	

Techniques pour l'analyse des produits PCR obtenus

Les produits de PCR, obtenus à partir des gènes réarrangés des immunoglobulines et du TCR, ont été analysés pour la distinction entre les cellules lymphoïdes monoclonales ayant des régions de jonction identiques et celles qui sont polyclonales à jonction très diversifiée.

La première technique consiste en une analyse des hétéroduplex. Elle utilise les produits de PCR double-brins et se base sur la longueur et la composition des régions de jonction. En effet, les produits de PCR obtenus sont dénaturés à haute température (95°C pendant 5 min), puis renaturés d'une façon aléatoire et rapide à basse température (4°C pendant 1 h). Dans le cas de lymphoproliférations polyclonales, de nombreux types d'hétéroduplex se forment avec des vitesses de migration différentes. Par contre, dans le cas de lymphoproliférations monoclonales, il y a la formation d'homoduplex avec une migration rapide. L'électrophorèse des homoduplex dans un gel de polyacrylamide (6%) produit une seule bande d'une taille prévisible, tandis que les hétéroduplex forment une traînée à un niveau plus élevé du gel (**Figure 30A**).

La deuxième technique est le Gene Scanning qui exige l'utilisation d'amorces marquées par un fluorochrome (6-FAM) pour réaliser la PCR, afin de permettre ultérieurement la détection des produits de PCR obtenus avec un séquençage automatisé. Cette technique est basée sur la longueur des produits amplifiés seulement.

Dans un premier temps, le mélange présent dans le tableau suivant a été préparé :

Produits de PCR	1 microlitre
Formamide	20 microlitres

ROX-500	0.5 microlitres
---------	-----------------

Ensuite, les produits de PCR ont été dénaturés à 95°C pendant 4 min et immédiatement refroidis dans la glace. Enfin, les brins monocaténaire ont été séparés dans un polymère de séquençage capillaire et détectés *via* un balayage automatisé avec un laser.

Il en résulte une distribution gaussienne de pics multiples, représentant de nombreux produits de PCR différents en cas de lymphoproliférations polyclonales mais avec un seul pic composé d'un seul type de produits de PCR dans le cas d'une lymphoprolifération entièrement monoclonale (**Figure 30B**).

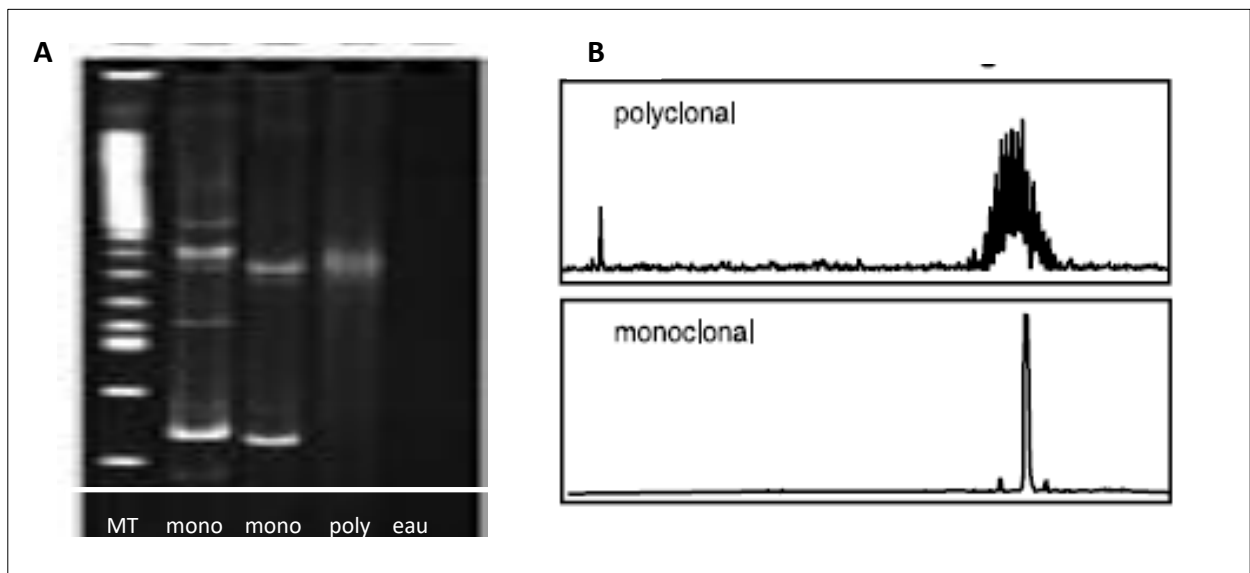


Figure 30 : Schéma de l'analyse hétéroduplex (A) et Gene Scanning (B) des produits de PCR, obtenus à partir des réarrangements des gènes des Ig et du TCR. (Modifié d'après (van Dongen et al., 2003).

VII. Publication

Chapitre VII. Publication

Introduction

Le virus d'Epstein-Barr est un herpèsvirus humain qui infecte plus de 90% de la population mondiale. L'infection s'effectue dans la petite enfance et la transmission est principalement salivaire. La primo-infection est souvent asymptomatique, mais lorsqu'elle est symptomatique, elle est responsable de la mononucléose infectieuse. Suite à la primo-infection, le virus entre en latence, et persiste toute la vie dans l'organisme. Dans certains contextes (immunodépression, inflammation importante..), il peut reprendre un cycle réplcatif, produisant de nombreuses particules virales à partir des cellules épithéliales. A côté des manifestations liées à la primo-infection, l'EBV est décrit pour être associé à plusieurs pathologies cancéreuses humaines comme les carcinomes nasopharyngés et gastriques et divers lymphomes comme le lymphome de Burkitt et les lymphomes NK/T, certains lymphomes de Hodgkin.

Le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI) a été décrit dans les années 70. Il fait partie des lymphomes T périphériques. Il s'agit d'une pathologie agressive, rarement accessible à la thérapeutique, à pronostic sombre. Les cellules néoplasiques sont des lymphocytes T à cytoplasme clair dérivant des cellules folliculaires T helper.

L'EBV est toujours trouvé dans les cellules B et occasionnellement dans les cellules néoplasiques T. Mais jusqu'à présent le rôle de l'EBV dans la pathogenèse de cette maladie reste inconnu et on peut constater que peu d'études ont été faites sur le sujet. Par exemple, on ne sait pas si le virus est présent sous une forme lytique ou sous une forme latente et dans ce dernier cas, quelles protéines sont exprimées. Ces questions sont importantes à résoudre afin d'y voir plus clair sur la physiopathologie de cette maladie.

La problématique de cet article est de déterminer si un virus particulier est associé au LTAI et si l'EBV possède un pouvoir oncogénique dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons étudié la séquence complète de l'EBV au sein d'échantillons de LTAI et comparé cette

séquence aux résultats obtenus pour d'autres lymphomes (B, NK/T) ainsi qu'aux séquences publiées.

L'enrichissement en génome viral a été réalisé par capture à l'aide de sondes spécifiques du génome de l'EBV. Ensuite les librairies ont été synthétisées et séquencées sur la plateforme *Illumina Miseq* et *NextSeq*. Les données obtenues ont été analysées bioinformatiquement.

D'une manière intéressante, le virus est clonal ou quasi-clonal dans les LTAI alors que les lymphocytes B sont polyclonaux dans la plupart des cas. En outre, le profil de mutations trouvé présente des similitudes avec les autres lymphomes associés à l'EBV, notamment au niveau des épitopes cibles des cellules de l'immunité. Ceci pourrait jouer un rôle important dans l'échappement au système immunitaire du virus dans ce contexte multicellulaire complexe.

Epstein-Barr virus is mostly latent and clonal in angioimmunoblastic T cell lymphoma

Racha Bahri¹, François Boyer², Jean Feuillard³, Arnaud Jaccard⁴, and Sylvie Ranger-Rogez^{1,5}

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, CRIBL, UMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST Limoges, France

²CRIBL, UMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST, Limoges, France

³ Department of Biological Hematology, CBRS, UMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST, Limoges, France

⁴Department of Clinical Hematology, University Hospital Dupuytren, Limoges, France

⁵Department of Virology, CBRS, Limoges, France

Corresponding author: Pr Sylvie ROGEZ, Laboratoire de Microbiologie, Faculté de Pharmacie, 2 rue du Dr Marcland, 87025, Limoges, France

Affiliation: UMR CNRS 7276, FR 3503 GEIST

Tel: +33 555 056 721 – Fax: +33 555 056 722 – Mail: sylvie.rogez@unilim.fr

Key words: angioimmunoblastic T lymphoma, EBV, clonal, latent, NGS

No potential conflicts of interest were disclosed.

Chapitre VIII. Discussion générale, perspectives et conclusion

Chapitre VIII. Discussion générale, perspectives et conclusion

Dans ce travail, nous avons mis en évidence la présence de l'EBV dans les LTAI de manière clonale ou quasi-clonale. En outre, il possède un profil de mutations qui ne lui est pas spécifique mais qui ressemble à celui trouvé dans les autres lymphomes B et NK/T associés à l'EBV.

Ce travail a permis d'identifier également que les mutations étaient localisées majoritairement au niveau des protéines de latence et notamment au niveau des épitopes cibles de cellules CD4+ et CD8+.

Au cours de cette discussion, plusieurs points majeurs de l'étude seront mis en avant et corrélés avec les études réalisées au préalable. Des perspectives pour ce projet seront aussi envisagées.

VIII.1. Les patients

Le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI) est le lymphome périphérique le plus répandu en Europe. Il représente 28% des lymphomes T périphériques (Federico et al., 2013; Vose et al., 2008).

Il survient principalement chez les personnes âgées avec un âge médian entre 59 et 65 ans (Sonnen et al., 2005; Tobinai et al., 1988) et un rapport homme/femme égal à 1.

Dans notre série, l'âge médian était de 64 ans ce qui s'accorde avec la littérature. Cependant, le rapport homme/femme était de 0.5, probablement dû au petit nombre de cas étudiés (20 cas).

VIII.2. Notre objectif

L'EBV est estimé présent dans au moins 80 % des biopsies issues de lymphomes LTAI (Anagnostopoulos et al., 1992; Weiss et al., 1992). Il est toujours trouvé dans les cellules B et occasionnellement dans les cellules T néoplasiques. Les hypothèses émises pour expliquer le rôle de l'EBV dans les LTAI sont différentes. Des études supposent que sa présence est un fait secondaire au déficit immunitaire dans les LTAI (Huang et al., 2012), d'autres suggèrent que l'EBV pourrait jouer un rôle important dans la lymphomagenèse et la progression de la

pathologie *via* la sécrétion des cytokines et chimiokines (Zhou et al., 2007). Jusqu'à aujourd'hui, son rôle reste inconnu.

En se basant sur des données connues sur les séquences du génome de l'EBV, une étude récente a montré qu'une variation d'un seul acide aminé dans la protéine EBNA-2 est essentielle pour augmenter sa capacité de transformation. Cette étude montre ainsi que de très petites différences de séquence peuvent avoir un effet important sur le phénotype de l'EBV (Tzellos et al., 2012). D'autres études démontrent qu'une délétion de 30 pb dans le gène LMP-1 est associée à un mauvais pronostic chez les patients ayant un lymphome NK/T, et est décrite comme particulièrement oncogène (Halabi et al., 2016). Il est alors possible qu'il existe un virus plus oncogène, qui serait retrouvé plus spécifiquement dans une pathologie donnée.

Quant aux lymphomes LTAI, ni le génome de l'EBV, ni les régions spécifiques du génome n'ont été séquencés.

Dans ce contexte, nous nous sommes demandé si le virus présent dans les LTAI possède un profil oncogénique, c'est à dire un profil de mutations similaire à celui retrouvé dans les autres types de lymphomes B et NK/T associés à l'EBV. Cette connaissance permettra de mieux cerner les mécanismes de la lymphomagenèse et d'envisager à terme, une approche thérapeutique.

Pour ce faire, on a séquencé le génome entier de l'EBV dans les LTAI.

VIII.3. Le génome complet

Le séquençage du génome entier de l'EBV dans les LTAI pourrait nous donner une information globale sur toutes les régions du génome (codantes, non codantes) et plus particulièrement sur les éventuelles variations, si elles existent, dans les différentes catégories de protéines fonctionnelles (Tabouriech et al., 2006).

En effet, dans des études antérieures, le séquençage du génome entier a clairement révélé une diversité de séquences dans de nombreuses régions génomiques inattendues de l'EBV, telles que des régions codantes du tégment ; à titre d'exemple les gènes *BPLF-1* et *BOLF-1* (Kwok et al., 2014).

Plutôt que de se baser uniquement sur les variations dans la partie C-terminale de LMP-1 et/ou d'EBNA-1 (Liu et al., 2011), le séquençage complet du génome est, ici, plus adapté pour déterminer s'il existe une souche monoclonale ou non d'EBV. En effet, la protéine LMP-1 se divise en 6 sous-types (China1, China2, Med-, Alaskan, B95.8 et Argentine) et EBNA-1 en 5 sous-types (P-ala, P-thr, V-leu, V-val, et V-pro) suivant les signatures de mutations trouvées dans leur partie C-terminale. Dans des études asiatiques portant sur les carcinomes nasopharyngés, la présence d'un seul sous-type d'EBNA-1 ou de LMP-1 révèle la monoclonalité de l'EBV (Shibata et al., 2006 ; Liu et al., 2011).

Dans ce contexte, nous avons séquencé le génome « entier » de l'EBV dans les LTAI, ce qui nous a permis de repérer les variations au niveau génomique dans un premier temps et de déterminer ensuite la clonalité du virus trouvé. Cette dernière a été définie en se basant sur le taux d'hétérogénéité, c'est-à-dire le nombre de mutations ayant une fréquence entre 20 et 94 %, par rapport à la référence de l'EBV.

VIII.4. Technique

La grande taille du génome de l'EBV (172kb) associée à une faible quantité d'ADN viral par rapport à l'ADN cellulaire dans l'échantillon tumoral, présente un défi de séquençage (Palser et al., 2015). Dans les LTAI, le virus est présent seulement dans une population cellulaire non tumorale, les immunoblastes CD20+ (Carbone et al., 2008).

Par conséquent, pour enrichir en génome viral, nous avons utilisé la technique de capture par hybridation avec des sondes spécifiques de l'EBV. Ces dernières couvrent les génomes de 2 souches prototypes d'EBV : NC_007605 (prototype de l'EBV1) et NC_009334 (prototype de l'EBV2).

Cependant, l'approche d'enrichissement de la cible était limitée puisque seulement deux références ont été utilisées pour concevoir les sondes de l'EBV. Ainsi, si de nouvelles séquences sont présentes, elles pourraient ne pas être capturées par le processus de séquençage, résultant des régions non couvertes du génome. Heureusement, dans notre étude, les seuls vides « gaps » observés pourraient être expliqués par la présence de régions répétées non couvertes.

Après avoir lancé un premier run sur la plateforme MiSeq (8 gigaoctets de données, soit environ 1000 bases de profondeur, 30 millions de lectures) et avoir analysé les résultats, nous avons constaté que la technique n'est pas adaptée pour les échantillons <100 000 copies virales /microgramme d'ADN. Il s'agit là, du seuil de sensibilité estimé de cette technique. Nous avons alors décidé de repasser les bibliothèques préparées sur le NextSeq en partant du principe que cette technique pourrait augmenter le nombre de lectures, d'une grandeur de 5 fois (recommandation du fabricant). Par conséquent, deux plateformes ont été utilisées : MiSeq (>100 000 copies/microgrammes) et NextSeq (<100 000 copies/microgrammes).

VIII.5. Validation de la technique

Parmi les lignées cellulaires que nous avons séquencées : B95.8, Raji, P3HR1, Jijoye ont déjà été séquencés. Les numéros d'accession dans GenBank sont respectivement les suivants V01555.2/ KF717093.1/ LN827548.2/ LN827800.1. Nous les avons reséquencé dans cette étude dans le but de valider la technique. Cependant, aucune publication concernant les séquençages de MEC04, SNK6 et Namalwa n'est connue, aussi il serait intéressant d'avoir leurs séquences et de les soumettre dans le GeneBank.

Des discordances mineures ont été observées, en alignant les lectures obtenues par NGS pour les lignées séquencées dans notre étude et leurs génomes déjà publiés. Plusieurs raisons pourraient expliquer ces écarts. La plupart de ces mutations mineures sont situées dans les régions répétées et les segments d'homopolymères. Ces derniers sont sujets à des erreurs de séquençage. Le reste pourrait être la conséquence d'une culture cellulaire prolongée.

Nos résultats sont proches des séquences publiées. Ils valident le flux de travail de séquençage utilisé ici ; celui-ci est fiable pour obtenir des séquences génomiques de l'EBV.

En outre, le séquençage par Sanger de 5 gènes (3 lytiques : *BORF-1*, *BMRF-1*, *BFRF-1* et 2 latents : *EBNA-1* et *EBNA-3A*) dans toutes les lignées résulte en la détection des mêmes mutations que trouvées par le séquençage NGS, ce qui constitue une preuve supplémentaire pour la validation de la technique.

VIII.6. Deux approches utilisées pour l'analyse des résultats bioinformatiques

Dans notre étude, nous avons utilisé les deux approches qui sont la cartographie avec une référence « read mapping » et l'assemblage *de novo*.

L'alignement des lectures (reads) obtenues pour chaque échantillon avec une référence est choisi dans le cas des séquences de variabilité moyenne à élevée, comme celles des gènes de latence. Cependant, il pourrait manquer de grandes insertions et délétions.

L'assemblage *de novo*, tel que celui obtenu en utilisant Velvet, peut détecter ces dernières mais pourrait aussi générer de petites insertions et délétions erronées.

Ceci montre que les deux approches sont complémentaires et permettent d'obtenir des génomes d'EBV plus complets et précis comme décrit précédemment (Kwok et al., 2014).

Concernant les répétitions majeures IR2, IR3 et IR4, nous n'avons pas pu obtenir leurs séquences, tout comme les projets de séquençage d'EBV déjà faits. Cependant, pour pouvoir compléter la séquence complète des génomes d'EBV crée par l'assemblage *de novo*, nous avons ajouté des « N » dans ces régions.

VIII.7. Mutations

Répartition des mutations sur les différentes catégories de protéines virales

Conformément aux travaux précédents de séquençage (Kwok et al., 2014, Liu et al., 2015, Palser et al., 2015), nous avons remarqué que la fréquence la plus élevée de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) non synonyme était trouvée au niveau des gènes latents, suivie par la fréquence au niveau des gènes codant des téguments et des glycoprotéines membranaires.

La plupart des mutations trouvées dans les gènes latents ont été décrites pour entraîner des changements d'acides aminés dans les épitopes cibles des cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Ces changements ont déjà été définis dans des publications antérieures (Hislop et al., 2007 ; Long et al., 2011 ; Sitompul et al., 2012) dans lesquelles ils expliquent que ces mutations sont la conséquence de la sélection positive dans ces gènes de latence (Khanna et al., 1997 ; Midgley et al., 2003). Elles peuvent également conférer la capacité d'évasion immunitaire des cellules infectées par l'EBV, soulignant l'importance potentielle de développer des

stratégies thérapeutiques contre les malignités associées à l'EBV (Bell et al., 2008 ; Icheva et al., 2013 ; Rooney et al., 2014).

Cependant, nous n'avons pas trouvé de telles mutations au niveau des protéines lytiques, y compris BZLF1, BRLF1, BCRF1 et BLLF1, comme l'ont montré d'autres travaux (Hislop et al., 2007 ; Long et al., 2011 ; Sitompul et al., 2012). Par ailleurs, de nombreuses mutations (dont les fonctions ne sont pas encore décrites) ont été trouvées au niveau du gène BZLF1 chez le patient AIL2. Ces mutations pourraient influencer l'état lytique/latent du virus mais cette hypothèse doit cependant être exploitée.

Etude de mutations au niveau des protéines de latence

Les différentes mutations que nous avons détectées au niveau des protéines de latence ainsi que leurs fonctions (si elles sont connues) sont résumées dans l'annexe 2.

EBNA-1

Concernant la protéine EBNA-1, elle est essentielle pour le maintien de l'épisome viral dans les cellules infectées de manière latente et est le seul antigène viral qui soit systématiquement exprimé dans toutes les tumeurs malignes associées à l'EBV (Young et al., 2003).

L'acide aminé à la position 487 associé à un panel de variations dans le domaine carboxy-terminal peut déterminer la « signature » de la protéine EBNA-1. Selon ces variations, EBNA-1 a été classé en cinq sous-types : P-ala, P-thrV, P-leuV, P-valV et P-proV (Snudden et al., 1995 ; Wang et al., 2009).

Dans notre étude, nous avons pu observer : 29 patients avec le sous-type P-thrV d'EBNA-1, 1 patient avec le P-valV, 1 patient avec le P-proV et 3 patients avec le P-ala. Chez les patients ayant un LTAI, 15 ont été identifiés comme portant le sous-type P-thrV et un LTAI (AIL18) comme portant le sous-type le P-ProV. AIL2 et AIL11 qui portent un EBV quasi clonal, présentent le variant sauvage de référence : P-ala.

Le P-thrV, sous-type le plus répandu dans notre série de patients, présente 10 mutations non synonymes par rapport à la séquence EBNA-1 de l'EBV-WT (*Wild Type*) comme déjà décrit (Sun et al., 2015). Nous les avons toutes identifiées : Val429Met, Pro476Gln, Ala487Thr, Ser492Cys, Met563Ile, Val574Gly, Thr585Pro, Arg594Lys, Val595Ala.

Le P-thrV est le sous-type le plus communément observé dans le sang périphérique des lymphomes américains et africains ainsi que dans les tumeurs africaines (Chen et al., 1998 ; Chang et al., 1999 ; Habeshaw et al., 1999 ; Fassone et al., 2002 ; Greiner et al., 2000).

Très peu d'études ont traité la séquence de la protéine EBNA-1 dans les lymphomes issus de patients européens, c'est pourquoi les données sur le type d'EBNA-1 n'existent pas.

Dans des études antérieures, le sous-type P-valV a été identifié comme le plus représenté dans divers échantillons EBV-positifs (lymphome, NPC, EBVaGC, et donneurs sains) en Asie alors qu'il est rarement trouvé dans les régions non asiatiques (Gutiérrez et al., 1997 ; 1998 ; Sandvej et al., 2000 ; Wang et al., 2010 ; Chen et al., 2010).

Nous avons trouvé dans notre étude 1 P-valV, ce qui est cohérent avec les données de la littérature.

Les individus sains portent souvent plusieurs sous-types d'EBNA-1, les plus courants étant P-ala. Par contre, dans les tumeurs associées à l'EBV examinées à ce jour, un seul sous-type est récurrent mais qui n'est pas (ou que très rarement) le P-ala (Gutiérrez et al., 1998). Ces données suggèrent que les variations d'EBNA-1 pourraient être essentielles à l'EBV pour pouvoir persister dans différents types de cellules, et seraient donc pertinentes à son potentiel oncogénique (Bhatia et al., 1996).

Il existe également des altérations particulières des acides aminés dans le domaine N-terminal de la protéine EBNA-1. Ces mutations accompagnent normalement les mutations de la signature 487 parmi lesquelles on cite : Glu16Gln, Gly18Glu, Glu24Asp, Gly27Ser, Val70Ala, Gln74Pro, Thr85Ala. Ces mutations sont localisées dans une région importante pour la transcription des gènes transformants.

Toutes les mutations détectées dans les épitopes cibles des cellules CD4+ et CD8+ dans EBNA-1 servent à l'échappement des cellules infectées par l'EBV au système immunitaire (Gutiérrez et al., 1997 ; 1998 ; Kwok et al., 2012 ; 2014 ; Liu et al., 2015) à l'exception de la mutation qui se trouve au niveau de l'acide aminé 524. En effet, à cette position, l'alanine qui remplace la thréonine, correspond à un changement de l'épitope (VNLRRGTAL) reconnu par le CTL (lymphocyte T cytotoxique). Cette variation est connue pour activer le système immunitaire (Bell et al., 2008).

EBNA-LP

Pour la protéine EBNA-LP, il a été relativement difficile de déterminer les variants puisqu'elle est codée par certains exons situés au niveau de la région répétée IR1. Par ailleurs, nous avons masqué cette région durant la quasi-totalité de l'analyse bioinformatique, conduisant à la perte d'importantes mutations.

EBNA-2

À côté des mutations trouvées dans les épitopes cibles des cellules CD4+ et CD8+, la protéine EBNA-2 chez les patients AIL1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 13, 15, 17 est mutée au niveau du signal de localisation nucléaire (NLS), ce qui explique leur présence dans une branche distante des autres LTAI (AIL2, AIL11, AIL14 et AIL16) dans l'arbre phylogénique.

EBNA-3

Quant aux EBNA-3, ils constituent des cibles de la reconnaissance immunitaire au cours de l'infection persistante, ce qui a été proposé pour expliquer la plus grande ampleur des variations non-synonymes dans ces gènes (Khanna et al., 1997 ; Midgley et al., 2003). La plupart de ces mutations sont au niveau des épitopes cibles de CD4+ et CD8+.

LMP-1

Outre les mutations dans les épitopes cibles des cellules immunitaires, une mutation importante a été détectée pour les LTAI (à l'exception du patient AIL2) et pour les autres types de lymphomes. En effet, il s'agit d'une isoleucine remplacée par une leucine à la position 185. Cette mutation pourrait agir sur l'homo/oligo dimérisation de la protéine ainsi que dans l'interaction de LMP-1 avec d'autres molécules des radeaux lipidiques et par conséquent les voies de signalisation impliquées dans l'immortalisation.

LMP-2A

La protéine LMP-2A contient des résidus tyrosines (Y) aux positions 74 et 85 par lesquelles elle peut interagir avec les kinases SYK et LYN. Cette interaction séquestre LYN du complexe BCR, entraînant ainsi une inhibition des voies de signalisation des cellules B. Les voies PI3K et AKT sont également activées suite à la phosphorylation d'AKT, entraînant une

survie cellulaire (Damania, 2004). Ces tyrosines ne sont pas mutées dans notre série de patients, suggérant la persistance du rôle de la protéine LMP-2A dans l'immortalisation dans les LTAI tout comme dans les autres types de pathologies étudiées.

LMP2A recrute également des protéines ubiquitine ligases de type NEDD4 à travers des motifs de phosphotyrosine (PY) situés aux positions (63-64) et (67-68). Ces protéines favorisent la dégradation de LYN et de LMP2A par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine (Ikeda et al., 2000). Dans notre série, la tyrosine à la position 64 est substituée par une asparagine, ce qui pourrait inhiber la dégradation de la protéine LMP2A.

Cette mutation est aussi bien présente chez les patients ayant un LTAI (à l'exception de AIL2) que dans les autres pathologies.

Rancan et ses collaborateurs ont décrit en 2014, que la présence de la protéine LMP2A dans les cellules infectées par l'EBV sert à leurs évasions du système immunitaire (Rancan et al., 2015). En effet, les clones de cellules T CD8 + ont montré une réactivité plus élevée contre les LCL déficientes en LMP2A par rapport aux LCL infectées par l'EBV sauvage.

VIII. EBV dans le micro-environnement tumoral

Plusieurs études ont décrit l'interaction entre les cellules T_{FH} tumorales et les cellules EBV+.

L'EBV code pour des cytokines, des chimiokines et des récepteurs homologues à ceux qui sont produits chez l'homme. A titre d'exemple, il code pour la protéine virale BCRF1 qui est un homologue de l'IL-10 (Moore et al, 1990). En outre, l'EBV module la production des cytokines, des chimiokines telles qu'IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- γ , TNF- α et CCL5 par les lymphocytes et les cellules inflammatoires telles que les monocytes (Gosselin et al, 1992 ; Flamand et al, 1995 ; Klein et al., 1996 ; Arena et al, 1999 ; Arena et al, 2001, Uchihara et al., 2005). En se basant sur ces données, l'équipe de Zhou a montré en 2007 que l'infection par l'EBV pourrait jouer un rôle primordial dans la progression des lymphomes LTAI par des mécanismes paracrines (Zhou et al., 2007).

Dans une deuxième étude, Dunleavy et ses collaborateurs ont émis l'hypothèse qu'il pourrait exister un rôle étiologique possible de l'EBV dans les LTAI et que la prolifération clonale des lymphocytes T pourrait initialement correspondre à un processus spécifique

d'antigène (Dunleavy et al., 2007). En effet, les cellules B EBV+ présentent les protéines virales (telles que EBNA-1 et LMP-1) en association avec les molécules du CMH-II aux cellules T_{FH} (Long et al., 2005; Widney et al., 2003). Cet événement pourrait fournir des signaux stimulateurs pour l'activation des cellules T_{FH} conduisant à la production de CXCL13. Cette chimiokine facilite le recrutement des cellules B dans les ganglions par interaction avec les HEV (*High endothelial venules*) et les capillaires dans les centres germinatifs. Les cellules B se développent et s'activent dans le paracortex, ce qui permet la création d'une boucle d'amplification. Dans cette boucle, une cellule B EBV+ pourrait fournir le stimulus menant à l'émergence d'une cellule T_{FH} indépendante de l'antigène.

Dans une troisième étude, Gaulard et ses collaborateurs ont montré la présence d'un réseau complexe d'interactions entre les cellules T_{FH} tumorales et les cellules de l'environnement parmi lesquels les immunoblastes EBV+ (détaillé dans la partie IV de la partie bibliographique).

Dans notre étude, et d'une manière intéressante, le virus a été trouvé clonal ou quasi-clonal dans les LTAI alors que les lymphocytes B étaient dans la plupart des cas polyclonaux. La présence de cellules B polyclonales avec un EBV clonal dans un compartiment T tumoral clonal pourrait relever d'une double sélection tumorale, endogène T et exogène EBV clonal, et pourrait suggérer l'existence de « cross-talk » entre les cellules B-T, ce qui s'accorde avec les 3 études précédentes. Ce dialogue nécessite d'être étudié pour mieux comprendre la physiopathologie des lymphomes LTAI.

Suite des perspectives

L'échappement au système immunitaire est un mécanisme utilisé par l'EBV pour se maintenir plus longtemps dans les cellules infectées. Les miARN viraux jouent un rôle permettant de renforcer cet échappement par le ciblage des différents mécanismes d'action cellulaire (Blum et al., 2013).

En outre, les microARN pourraient jouer un rôle important dans l'inhibition de l'apoptose et la prolifération cellulaire dans les lymphomes B, T et NK.

Les microARN impliqués, leurs cibles ainsi que leurs fonctions sont résumés dans la **figure 31** pour les lymphomes B et dans le **tableau 15** pour les lymphomes NK et T.

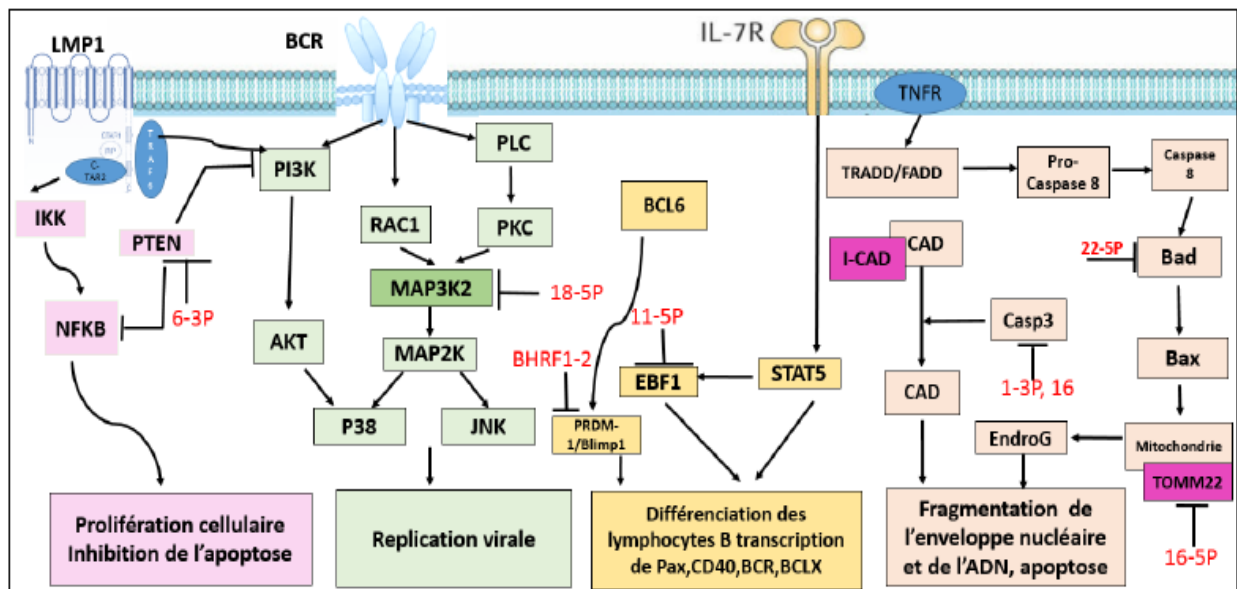


Figure 31 : Les cibles cellulaires de miARN de l'EBV dans les lymphomes B. BCR : B Cell Receptor ; Bax : Bcl2 activated X ; Bad : Bcl2 associated Death Promotor ; CAD : Caspase Activated Dnase ; I-CAD : Inhibitor of CAD ; EBF1 : Early B cell Factor ; NFKB : Nuclear Factor Kappa-Light-Chain enhancer ; MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase ; PRDM1/Blimp1 : Positive Regulating Domain ; PTEN : Phosphatase and Tension Homolog ; STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription protein ; PI3K : Phospholinositide 3-Kinase ; JNK : C-Jun NH2 Terminal Kinase ; PLC : Phospholipase de type C ; TNFR : Tumor Necrosis Factor Receptor ; TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain containing protein ; TOMM22 : Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 22.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des miARN de l'EBV, de leurs cibles et de leurs fonctions dans les lymphomes NK et T. NK : Natural Killer.

MiARN	Cible		Fonctions	Références
Mi-BART9	Virale	LMP1	Prolifération et Développement cellulaire	Lanier et al 2008
Mi-BART20-5p	Cellulaire	T-Bet P53	Inhibition de l'apoptose	Lin et al 2013
Mi-BART20-5, BART8	Cellulaire	IFNI, STAT1	Inhibition de la prolifération, l'apoptose, échappement immunitaire	Huang et al 2013
Mi-BART1-3, 3	Cellulaire	IPO7	Echappement immunitaire	Yang et al 2009, vereide et al 2013, Dölken et al 2010
Mi-BART2-5P	Cellulaire	CMH-I	Echappement immunitaire	Nachmani et al 2009
Mi-BART15	Cellulaire	NLRP3	Echappement immunitaire	Haneklaus et al 2012

Par ailleurs, les miARN pourraient également être impliqués dans l'inhibition du cycle lytique et ainsi jouer un rôle dans le maintien de la latence dans les lymphomes B.

En effet, le miR-BART2-5P inhibe la réplication du génome viral en ciblant l'ARNm codant la protéine BALF5, inhibant par la suite la synthèse de cette protéine qui est équivalente à l'ADN polymérase cellulaire et responsable de l'initiation de la réplication génomique virale (Barth et al., 2008 ; Lung et al., 2009).

Le miR-BART6-5P possède plusieurs cibles. Le Dicer, une protéine cellulaire importante pour la réplication virale, est inhibée par ce miARN qui possède plusieurs sites de fixation au niveau de la région 3'UTR de l'ARNm (Lewis et al., 2005). De plus, la protéine virale oncogénique EBNA-2, joue un rôle important au cours de la réplication virale et l'activation d'une réponse immunitaire forte est inhibée par ce miARN (Iizasa et al., 2010).

L'implication dans le maintien de la latence de miR-BART20-5P a été identifiée, notamment en inhibant la synthèse des protéines immédiates « IE » BZLF1, codant Zta, et

BRLF1, codant Rta, qui sont des facteurs de transcription pour la réplication virale et la synthèse de nouveaux virions (Jung et al., 2014).

Le miR-BART18-5P hautement exprimé dans les lymphocytes B et analogue à un miARN cellulaire, et le miR-26a-5P, impliqué dans la cancérogenèse, présentent une relation avec la latence en ciblant l'ARNm de MAP3K2, un facteur de la voie des MAP kinases, hautement exprimé au cours de la phase lytique. Cette voie joue un rôle important dans la réplication virale puisque l'inhibition de l'un de ses facteurs inhibe toute la voie et favorise le maintien de la latence (Qiu and Thorley-Lawson, 2014).

Nous avons mis en évidence la présence de deux processus parmi ceux qui sont décrits ci-dessus dans les LTAI : la latence et l'évasion du virus du système immunitaire.

Parmi les perspectives à envisager : nous pouvons évoquer le séquençage des microARN viraux, vu leur importance dans la survie cellulaire et l'immortalisation. Cela permettra d'avoir la signature génomique et le profil de microARN dans les LTAI, et donc faire la corrélation avec la survenue des tumeurs T.

Dans un second temps, nous nous intéresserons aux deux transcriptomes cellulaire et viral dans ces mêmes tissus provenant de lymphomes LTAI ainsi que des autres lymphoproliférations, afin de voir quels gènes sont exprimés. Ceci permettra de valider si le virus est présent sous une forme latente, et de déterminer son type de latence.

Le transcriptome cellulaire permet aussi de mieux comprendre les voies de signalisation, les régulations transcriptomiques et les autres mécanismes de pathogenèse.

Conclusion

En résumé, nous avons pu séquencer 34 génomes d'EBV. Pour 24 d'entre eux, nous avons créé les séquences complètes par l'assemblage *de novo* et les avons soumis dans GeneBank. Pour le reste c'est-à-dire les patients dont le nombre de copies virales est faible, nous avons soumis les fichiers fastq.

Cette étude a permis de montrer que l'EBV présent dans les LTAI est clonal ou quasi clonal alors que les lymphocytes B étaient dans la plupart des cas polyclonaux et que l'EBV est latent chez tous les patients atteints de LTAI excepté 1.

Nous avons également pu identifier que les LTAI présentaient des similitudes avec ce qui a été trouvé pour les autres lymphomes associés à l'EBV.

Nous avons mis en évidence que les mutations étaient plutôt localisées au niveau des gènes de latence, notamment au niveau des épitopes cibles des cellules de l'immunité. Ces mutations suggèrent un processus de sélection de la souche virale identique à celui d'une tumeur clonale associée à l'EBV.

A notre connaissance, il s'agit de la première fois que le génome complet de l'EBV est séquencé dans les LTAI, et également la première étude où sont discutés la clonalité et l'état lytique/latent du virus.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

1. A, H., George, T., Vm, K., and S, M.A. (2008). Arteriovenous malformation after transradial percutaneous coronary intervention. *Indian Heart J.* **60**, 64.
2. Abbot, S.D., Rowe, M., Cadwallader, K., Ricksten, A., Gordon, J., Wang, F., Rymo, L., and Rickinson, A.B. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* **64**, 2126–2134.
3. Abruzzo, L.V., Schmidt, K., Weiss, L.M., Jaffe, E.S., Medeiros, L.J., Sander, C.A., and Raffeld, M. (1993). B-cell lymphoma after angioimmunoblastic lymphadenopathy: a case with oligoclonal gene rearrangements associated with Epstein-Barr virus. *Blood* **82**, 241–246.
4. Adams, A., and Lindahl, T. (1975). Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**, 1477–1481.
5. Addinger, H.K., Delius, H., Freese, U.K., Clarke, J., and Bornkamm, G.W. (1985). A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* **141**, 221–234.
6. Advani, R.H., Hong, F., Horning, S.J., Kahl, B.S., Manola, J., Swinnen, L.J., Habermann, T.M., and Ganjoo, K. (2012). Cardiac toxicity associated with bevacizumab (Avastin) in combination with CHOP chemotherapy for peripheral T cell lymphoma in ECOG 2404 trial. *Leuk. Lymphoma* **53**, 718–720.
7. Advani, R.H., Ansell, S.M., Lechowicz, M.J., Beaven, A.W., Loberiza, F., Carson, K.R., Evens, A.M., Foss, F., Horwitz, S., Pro, B., et al. (2016). A phase II study of cyclophosphamide, etoposide, vincristine and prednisone (CEOP) Alternating with Pralatrexate (P) as front line therapy for patients with peripheral T-cell lymphoma (PTCL): final results from the T- cell consortium trial. *Br. J. Haematol.* **172**, 535–544.
8. Agostinelli, C., Piccaluga, P.P., Went, P., Rossi, M., Gazzola, A., Righi, S., Sista, T., Campidelli, C., Zinzani, P.L., Falini, B., et al. (2008). Peripheral T cell lymphoma, not otherwise specified: the stuff of genes, dreams and therapies. *J. Clin. Pathol.* **61**, 1160–1167.
9. Al Tabaa, Y., Tuaillon, E., Bollore, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J.-M., Duperray, C., Desgranges, C., and Vendrell, J.-P. (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* **113**, 604–611.
10. Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C., and Gascoigne, N.R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* **381**, 616–620.
11. Albanese, M., Tagawa, T., Bouvet, M., Maliqi, L., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Martin, L., et al. (2016). Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E6467–E6475.
12. Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. (1991). Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181**, 595–608.

13. Alfieri, C., Tanner, J., Carpentier, L., Perpète, C., Savoie, A., Paradis, K., Delage, G., and Joncas, J. (1996). Epstein-Barr virus transmission from a blood donor to an organ transplant recipient with recovery of the same virus strain from the recipient's blood and oropharynx. *Blood* 87, 812–817.
14. Allday, M.J., Crawford, D.H., and Griffin, B.E. (1989). Epstein-Barr virus latent gene expression during the initiation of B cell immortalization. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 7), 1755–1764.
15. Allday, M.J., Bazot, Q., and White, R.E. (2015). The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 391, 61–117.
16. Altmann, M., Pich, D., Ruiss, R., Wang, J., Sugden, B., and Hammerschmidt, W. (2006). Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14188–14193.
17. Ambepitiya, G.B. (1989). Angioimmunoblastic lymphadenopathy associated with thyroid disease. *J. Clin. Pathol.* 42, 668–669.
18. Ambinder, R.F., Shah, W.A., Rawlins, D.R., Hayward, G.S., and Hayward, S.D. (1990). Definition of the sequence requirements for binding of the EBNA-1 protein to its palindromic target sites in Epstein-Barr virus DNA. *J. Virol.* 64, 2369–2379.
19. Ambrosio, M.R., Navari, M., Di Lisio, L., Leon, E.A., Onnis, A., Gazaneo, S., Mundo, L., Ulivieri, C., Gomez, G., Lazzi, S., et al. (2014). The Epstein Barr-encoded BART-6-3p microRNA affects regulation of cell growth and immuno response in Burkitt lymphoma. *Infect. Agent. Cancer* 9, 12.
20. d'Amore, F., Relander, T., Lauritzsen, G.F., Jantunen, E., Hagberg, H., Anderson, H., Holte, H., Österborg, A., Merup, M., Brown, P., et al. (2012). Up-front autologous stem-cell transplantation in peripheral T-cell lymphoma: NLG-T-01. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 3093–3099.
21. Anagnostopoulos, I., Hummel, M., Finn, T., Tiemann, M., Korbjuhn, P., Dimmler, C., Gatter, K., Dallenbach, F., Parwaresch, M.R., and Stein, H. (1992). Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* 80, 1804–1812.
22. Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., and Allday, M.J. (2008). Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 27, 421–433.
23. Aozasa, K., Takakuwa, T., and Nakatsuka, S. (2005). Pyothorax-associated lymphoma: a lymphoma developing in chronic inflammation. *Adv. Anat. Pathol.* 12, 324–331.
24. Aronson, P.L., Thurm, C., Alpern, E.R., Alessandrini, E.A., Williams, D.J., Shah, S.S., Nigrovic, L.E., McCulloh, R.J., Schondelmeyer, A., Tieder, J.S., et al. (2014). Variation in care of the febrile young infant <90 days in US pediatric emergency departments. *Pediatrics* 134, 667–677.
25. Arrand, J.R., and Rymo, L. (1982). Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J. Virol.* 41, 376–389.

26. Arredouani, M.S., Bhasin, M.K., Sage, D.R., Dunn, L.K., Gill, M.B., Agnani, D., Libermann, T.A., and Fingerhuth, J.D. (2014). Analysis of host gene expression changes reveals distinct roles for the cytoplasmic domain of the Epstein-Barr virus receptor/CD21 in B-cell maturation, activation, and initiation of virus infection. *J. Virol.* **88**, 5559–5577.
27. Artavanis-Tsakonas, S., Matsuno, K., and Fortini, M.E. (1995). Notch signaling. *Science* **268**, 225–232.
28. Attygalle, A.D., Diss, T.C., Munson, P., Isaacson, P.G., Du, M.Q., and Dogan, A. (2004). CD10 expression in extranodal dissemination of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **28**, 54–61.
29. Au, W., Weisenburger, D.D., Intragumtornchai, T., Nakamura, S., Kim, W.-S., Sng, I., Vose, J., Armitage, J.O., Liang, R., and International Peripheral T-Cell Lymphoma Project (2009). Clinical differences between nasal and extranasal natural killer/T-cell lymphoma: a study of 136 cases from the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *Blood* **113**, 3931–3937.
30. Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., and Ciechanover, A. (2000). Degradation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *J. Biol. Chem.* **275**, 23491–23499.

B

31. Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**, 395–404.
32. Babcock, G.J., Decker, L.L., Freeman, R.B., and Thorley-Lawson, D.A. (1999). Epstein-Barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.* **190**, 567–576.
33. Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., and Séguin, C. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**, 207–211.
34. Bajaj, B.G., Murakami, M., Cai, Q., Verma, S.C., Lan, K., and Robertson, E.S. (2008). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J. Virol.* **82**, 4082–4090.
35. Banerjee, A.S., Pal, A.D., and Banerjee, S. (2013). Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* **443**, 294–305.
36. Banko, A., Lazarevic, I., Cupic, M., Stevanovic, G., Boricic, I., and Jovanovic, T. (2012). Carboxy-terminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein-Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J. Med. Virol.* **84**, 632–642.
37. Barth, S., Pfuhl, T., Mamiani, A., Ehses, C., Roemer, K., Kremmer, E., Jäker, C., Höck, J., Meister, G., and Grässer, F.A. (2008). Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Res.* **36**, 666–675.
38. van Beek, J., Brink, A.A.T.P., Vervoort, M.B.H.J., van Zijp, M.J.M., Meijer, C.J.L.M., van den Brule, A.J.C., and Middeldorp, J.M. (2003). In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV)

BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J. Gen. Virol.* **84**, 2647–2659.

39. Benoist, C., and Mathis, D. (1989). Positive selection of the T cell repertoire: where and when does it occur? *Cell* **58**, 1027–1033.
40. Birkenbach, M., Liebowitz, D., Wang, F., Sample, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus latent infection membrane protein increases vimentin expression in human B-cell lines. *J. Virol.* **63**, 4079–4084.
41. Bisig, B., Thielen, C., Herens, C., Gofflot, S., Travert, M., Delfau-Larue, M.-H., Boniver, J., Gaulard, P., and de Leval, L. (2012). c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma reflects follicular helper T-cell derivation rather than oncogenesis. *Histopathology* **60**, 371–376.
42. Blum J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* **31**, 443–473.
43. Bodescot, M., Chambrud, B., Farrell, P., and Perricaudet, M. (1984). Spliced RNA from the IR1-U2 region of Epstein-Barr virus: presence of an open reading frame for a repetitive polypeptide. *EMBO J.* **3**, 1913–1917.
44. Bodescot, M., Brison, O., and Perricaudet, M. (1986). An Epstein-Barr virus transcription unit is at least 84 kilobases long. *Nucleic Acids Res.* **14**, 2611–2620.
45. von Boehmer, H. (2005). Unique features of the pre-T-cell receptor alpha-chain: not just a surrogate. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 571–577.
46. Borenstein, J., Pezzella, F., and Gatter, K.C. (2007). Plasmablastic lymphomas may occur as post-transplant lymphoproliferative disorders. *Histopathology* **51**, 774–777.
47. Boroumand, N., Ly, T.L., Sonstein, J., and Medeiros, L.J. (2012). Microscopic diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) occurring in pseudocysts: do these tumors belong to the category of DLBCL associated with chronic inflammation? *Am. J. Surg. Pathol.* **36**, 1074–1080.
48. Borza, C.M., Morgan, A.J., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2004). Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J. Virol.* **78**, 5007–5014.
49. Bousso, P., Bhakta, N.R., Lewis, R.S., and Robey, E. (2002). Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy. *Science* **296**, 1876–1880.
50. Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *Br. J. Surg.* **46**, 218–223.
51. Burkitt, D. (1962). Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br. Med. J.* **2**, 1019–1023.
52. Burkitt, D., and O'conor, G.T. (1961). Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* **14**, 258–269.
53. Burkitt, D., and Wright, D. (1966). Geographical and tribal distribution of the African lymphoma in Uganda. *Br. Med. J.* **1**, 569–573.

54. Busson, P., McCoy, R., Sadler, R., Gilligan, K., Tursz, T., and Raab-Traub, N. (1992). Consistent transcription of the Epstein-Barr virus LMP2 gene in nasopharyngeal carcinoma. *J. Virol.* 66, 3257–3262.
55. Busson, P., Keryer, C., Ooka, T., and Corbex, M. (2004). EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virus-targeting strategies. *Trends Microbiol.* 12, 356–360.

C

56. Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., and Cullen, B.R. (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog.* 2, e23.
57. Cairns, R.A., Iqbal, J., Lemonnier, F., Kucuk, C., de Leval, L., Jais, J.-P., Parrens, M., Martin, A., Xerri, L., Brousset, P., et al. (2012). IDH2 mutations are frequent in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 119, 1901–1903.
58. Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405–411.
59. Campbell, J.J., Pan, J., and Butcher, E.C. (1999). Cutting edge: developmental switches in chemokine responses during T cell maturation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 2353–2357.
60. Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* 513, 202–209.
61. Carbone, A., Cesarman, E., Spina, M., Gloghini, A., and Schulz, T.F. (2009). HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 113, 1213–1224.
62. Carbone, A., Gloghini, A., and Dotti, G. (2008). EBV-associated lymphoproliferative disorders: classification and treatment. *The Oncologist* 13, 577–585.
63. Castillo, J.J., Beltran, B.E., Miranda, R.N., Young, K.H., Chavez, J.C., and Sotomayor, E.M. (2016). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 91, 529–537.
64. Casulo, C., and Friedberg, J. (2015). Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10, 266–271.
65. Cesarman, E. (2013). Pathology of lymphoma in HIV. *Curr. Opin. Oncol.* 25, 487–494.
66. Chen, A., Divisconte, M., Jiang, X., Quink, C., and Wang, F. (2005). Epstein-Barr virus with the latent infection nuclear antigen 3B completely deleted is still competent for B-cell growth transformation in vitro. *J. Virol.* 79, 4506–4509.
67. Chen, H., Smith, P., Ambinder, R.F., and Hayward, S.D. (1999). Expression of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts in latently infected B cells from peripheral blood. *Blood* 93, 3026–3032.
68. Cheng, C.L., and O'Connor, S. (2017). T cell-rich lymphoid infiltrates with large B cells: a review of key entities and diagnostic approach. *J. Clin. Pathol.* 70, 187–201.

69. Cheng, T.-C., Hsieh, S.-S., Hsu, W.-L., Chen, Y.-F., Ho, H.-H., and Sheu, L.-F. (2010). Expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in gastric carcinoma cells is associated with enhanced tumorigenicity and reduced cisplatin sensitivity. *Int. J. Oncol.* 36, 151–160.
70. Chiang, A.K., Tao, Q., Srivastava, G., and Ho, F.C. (1996). Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 68, 285–290.
71. Chim, C.-S., Ma, E.S.K., Loong, F., and Kwong, Y.-L. (2005). Diagnostic cues for natural killer cell lymphoma: primary nodal presentation and the role of in situ hybridisation for Epstein-Barr virus encoded early small RNA in detecting occult bone marrow involvement. *J. Clin. Pathol.* 58, 443–445.
72. Choy, E.Y.-W., Siu, K.-L., Kok, K.-H., Lung, R.W.-M., Tsang, C.M., To, K.-F., Kwong, D.L.-W., Tsao, S.W., and Jin, D.-Y. (2008). An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J. Exp. Med.* 205, 2551–2560.
73. Coffin, W.F., Erickson, K.D., Hoedt-Miller, M., and Martin, J.M. (2001). The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene* 20, 5313–5330.
74. Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 9558–9562.
75. Cohen, J.I., Dropulic, L., Hsu, A.P., Zerbe, C.S., Krogmann, T., Dowdell, K., Hornung, R.L., Lovell, J., Hardy, N., Hickstein, D., et al. (2016). Association of GATA2 Deficiency With Severe Primary Epstein-Barr Virus (EBV) Infection and EBV-associated Cancers. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 63, 41–47.
76. Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Zimmer, U., Rousselet, G., Pavlish, O., Banchereau, J., Tursz, T., Bornkamm, G., and Lenoir, G.M. (1990). Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J. Virol.* 64, 1002–1013.
77. Couronné, L., Bastard, C., and Bernard, O.A. (2012). TET2 and DNMT3A mutations in human T-cell lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 366, 95–96.
78. Cullen, B.R. (2011). Herpesvirus microRNAs: phenotypes and functions. *Curr. Opin. Virol.* 1, 211–215.

D

79. Dambaugh, T., Beisel, C., Hummel, M., King, W., Fennewald, S., Cheung, A., Heller, M., Raab-Traub, N., and Kieff, E. (1980). Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 2999–3003.
80. Dardalhon, V., Awasthi, A., Kwon, H., Galileos, G., Gao, W., Sobel, R.A., Mitsdoerffer, M., Strom, T.B., Elyaman, W., Ho, I.-C., et al. (2008). IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells. *Nat. Immunol.* 9, 1347–1355.

81. Dawson, C.W., Port, R.J., and Young, L.S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 22, 144–153.
82. Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., and Young, L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* 177, 339–349.
83. Del Prete, G. (1992). Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy* 47, 450–455.
84. Delecluse, H.J., Anagnostopoulos, I., Dallenbach, F., Hummel, M., Marafioti, T., Schneider, U., Huhn, D., Schmidt-Westhausen, A., Reichart, P.A., Gross, U., et al. (1997). Plasmablastic lymphomas of the oral cavity: a new entity associated with the human immunodeficiency virus infection. *Blood* 89, 1413–1420.
85. Delfau-Larue, M.-H., de Leval, L., Joly, B., Plonquet, A., Challine, D., Parrens, M., Delmer, A., Salles, G., Morschhauser, F., Delarue, R., et al. (2012). Targeting intratumoral B cells with rituximab in addition to CHOP in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. A clinicobiological study of the GELA. *Haematologica* 97, 1594–1602.
86. Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K.M., Kaye, K.M., Kleijnen, M.F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16, 7098–7108.
87. Dharnidharka, V.R. (2017). Peripheral Blood Epstein-Barr Viral Nucleic Acid Surveillance as a Marker for Posttransplant Cancer Risk. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 17, 611–616.
88. Dheekollu, J., Malecka, K., Wiedmer, A., Delecluse, H.-J., Chiang, A.K.S., Altieri, D.C., Messick, T.E., and Lieberman, P.M. (2017). Carcinoma-risk variant of EBNA1 deregulates Epstein-Barr Virus episomal latency. *Oncotarget* 8, 7248–7264.
89. van Dongen, J.J.M., Langerak, A.W., Brüggemann, M., Evans, P. a. S., Hummel, M., Lavender, F.L., Delabesse, E., Davi, F., Schuurin, E., García-Sanz, R., et al. (2003). Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH4-CT98-3936. *Leukemia* 17, 2257–2317.
90. Draoua, H.Y., Tsao, L., Mancini, D.M., Addonizio, L.J., Bhagat, G., and Alobeid, B. (2004). T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br. J. Haematol.* 127, 429–432.
91. Dunleavy, K., Wilson, W.H., and Jaffe, E.S. (2007). Angioimmunoblastic T cell lymphoma: pathobiological insights and clinical implications. *Curr. Opin. Hematol.* 14, 348–353.
92. Dupuis, J., Boye, K., Martin, N., Copie-Bergman, C., Plonquet, A., Fabiani, B., Baglin, A.-C., Haioun, C., Delfau-Larue, M.-H., and Gaulard, P. (2006). Expression of CXCL13 by neoplastic cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL): a new diagnostic marker providing evidence that AITL derives from follicular helper T cells. *Am. J. Surg. Pathol.* 30, 490–494.

93. Dupuis, J., Morschhauser, F., Ghesquières, H., Tilly, H., Casasnovas, O., Thieblemont, C., Ribrag, V., Bossard, C., Le Bras, F., Bachy, E., et al. (2015). Combination of romidepsin with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone in previously untreated patients with peripheral T-cell lymphoma: a non-randomised, phase 1b/2 study. *Lancet Haematol.* 2, e160-165.
94. Dykstra, M.L., Longnecker, R., and Pierce, S.K. (2001). Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* 14, 57–67.

E

95. Edreis, A., Mohamed, M.A., Mohamed, N.S., and Siddig, E.E. (2016). Molecular Detection of Epstein - Barr virus in Nasopharyngeal Carcinoma among Sudanese population. *Infect. Agent. Cancer* 11, 55.
96. El-Fattah, M.A. (2016). Clinical characteristics and survival outcome of primary effusion lymphoma: A review of 105 patients. *Hematol. Oncol.*
97. Eliopoulos, A.G., and Rickinson, A.B. (1998). Epstein-Barr virus: LMP1 masquerades as an active receptor. *Curr. Biol. CB* 8, R196-198.
98. Epstein, M.A., and Barr, Y.M. (1964). CULTIVATION IN VITRO OF HUMAN LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S MALIGNANT LYMPHOMA. *Lancet Lond. Engl.* 1, 252–253.
99. Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* 121, 761–770.
100. Erickson, K.D., and Martin, J.M. (1997). Early detection of the lytic LMP-1 protein in EBV-infected B-cells suggests its presence in the virion. *Virology* 234, 1–13.
101. Erickson, K.D., and Martin, J.M. (2000). The late lytic LMP-1 protein of Epstein-Barr virus can negatively regulate LMP-1 signaling. *J. Virol.* 74, 1057–1060.
102. Evens, A.M., Roy, R., Sterrenberg, D., Moll, M.Z., Chadburn, A., and Gordon, L.I. (2010). Post-transplantation lymphoproliferative disorders: diagnosis, prognosis, and current approaches to therapy. *Curr. Oncol. Rep.* 12, 383–394.

F

103. Faggioni, A., Zompetta, C., Grimaldi, S., Barile, G., Frati, L., and Lazdins, J. (1986). Calcium modulation activates Epstein-Barr virus genome in latently infected cells. *Science* 232, 1554–1556.
104. Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J. Virol.* 74, 5810–5818.
105. Fan, H., Kim, S.C., Chima, C.O., Israel, B.F., Lawless, K.M., Eagan, P.A., Elmore, S., Moore, D.T., Schichman, S.A., Swinnen, L.J., et al. (2005). Epstein-Barr viral load as a marker of lymphoma in AIDS patients. *J. Med. Virol.* 75, 59–69.

106. Farrell, K., and Jarrett, R.F. (2011). The molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *Histopathology* 58, 15–25.
107. Fassone, L., Bhatia, K., Gutierrez, M., Capello, D., Gloghini, A., Dolcetti, R., Vivenza, D., Ascoli, V., Lo Coco, F., Pagani, L., et al. (2000). Molecular profile of Epstein-Barr virus infection in HHV-8-positive primary effusion lymphoma. *Leukemia* 14, 271–277.
108. Fazilleau, N., Mark, L., McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells: lineage and location. *Immunity* 30, 324–335.
109. Federico, M., Rudiger, T., Bellei, M., Nathwani, B.N., Luminari, S., Coiffier, B., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Savage, K.J., et al. (2013). Clinicopathologic characteristics of angioimmunoblastic T-cell lymphoma: analysis of the international peripheral T-cell lymphoma project. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, 240–246.
110. Feederle, R., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011a). A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog.* 7, e1001294.
111. Feederle, R., Haar, J., Bernhardt, K., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011b). The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *J. Virol.* 85, 9801–9810.
112. Fennewald, S., van Santen, V., and Kieff, E. (1984). Nucleotide sequence of an mRNA transcribed in latent growth-transforming virus infection indicates that it may encode a membrane protein. *J. Virol.* 51, 411–419.
113. Flavell, J.R., Baumforth, K.R.N., Wood, V.H.J., Davies, G.L., Wei, W., Reynolds, G.M., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, G.L., Young, L.S., et al. (2008). Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* 111, 292–301.
114. Forte, E., and Luftig, M.A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect.* 13, 1156–1167.
115. Foss, H.D., Herbst, H., Hummel, M., Araujo, I., Latza, U., Rancsò, C., Dallenbach, F., and Stein, H. (1994). Patterns of cytokine gene expression in infectious mononucleosis. *Blood* 83, 707–712.
116. Foss, H.D., Anagnostopoulos, I., Herbst, H., Grebe, M., Ziemann, K., Hummel, M., and Stein, H. (1995). Patterns of cytokine gene expression in peripheral T-cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type. *Blood* 85, 2862–2869.
117. Frade, R., Barel, M., Ehlin-Henriksson, B., and Klein, G. (1985). gp140, the C3d receptor of human B lymphocytes, is also the Epstein-Barr virus receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82, 1490–1493.
118. Frappier, L. (2012). The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein. *Scientifica* 2012, 438204.
119. Fries, K.L., Miller, W.E., and Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J. Virol.* 70, 8653–8659.

120. Frizzera, G., Moran, E.M., and Rappaport, H. (1974). Angio-immunoblastic lymphadenopathy with dysproteinaemia. *Lancet Lond. Engl.* 1, 1070–1073.
121. Frizzera, G., Moran, E.M., and Rappaport, H. (1975). Angio-immunoblastic lymphadenopathy. Diagnosis and clinical course. *Am. J. Med.* 59, 803–818.
122. Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J. Virol.* 79, 8655–8660.
123. Fukuda, M., and Longnecker, R. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A mediates transformation through constitutive activation of the Ras/PI3-K/Akt Pathway. *J. Virol.* 81, 9299–9306.
124. Fukushima, N., Satoh, T., Sano, M., and Tokunaga, O. (2001). Angiogenesis and mast cells in non-Hodgkin's lymphoma: a strong correlation in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 42, 709–720.

G

125. Galanina, N., Kline, J., and Bishop, M.R. (2017). Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Ther. Adv. Hematol.* 8, 81–90.
126. Gallamini, A., Zaja, F., Patti, C., Billio, A., Specchia, M.R., Tucci, A., Levis, A., Manna, A., Secondo, V., Rigacci, L., et al. (2007). Alemtuzumab (Campath-1H) and CHOP chemotherapy as first-line treatment of peripheral T-cell lymphoma: results of a GITIL (Gruppo Italiano Terapie Innovative nei Linfomi) prospective multicenter trial. *Blood* 110, 2316–2323.
127. Ganjoo, K., Hong, F., Horning, S.J., Gascoyne, R.D., Natkunam, Y., Swinnen, L.J., Habermann, T.M., Kahl, B.S., and Advani, R.H. (2014). Bevacizumab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine and prednisone in combination for patients with peripheral T-cell or natural killer cell neoplasms: an Eastern Cooperative Oncology Group study (E2404). *Leuk. Lymphoma* 55, 768–772.
128. Garibal, J., Hollville, E., Bell, A.I., Kelly, G.L., Renouf, B., Kawaguchi, Y., Rickinson, A.B., and Wiels, J. (2007). Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J. Virol.* 81, 7598–7607.
129. Gaulard, P., and de Leval, L. (2014). The microenvironment in T-cell lymphomas: emerging themes. *Semin. Cancer Biol.* 24, 49–60.
130. Gerper, P., Whang-Peng, J., and Monroe, J.H. (1969). Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 63, 740–747.
131. Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J.* 18, 3064–3073.

132. Given, D., and Kieff, E. (1978). DNA of Epstein-Barr virus. IV. Linkage map of restriction enzyme fragments of the B95-8 and W91 strains of Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* 28, 524–542.
133. Glaser, S.L., Lin, R.J., Stewart, S.L., Ambinder, R.F., Jarrett, R.F., Brousset, P., Pallesen, G., Gulley, M.L., Khan, G., O’Grady, J., et al. (1997). Epstein-Barr virus-associated Hodgkin’s disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int. J. Cancer* 70, 375–382.
134. Glickman, J.N., Howe, J.G., and Steitz, J.A. (1988). Structural analyses of EBER1 and EBER2 ribonucleoprotein particles present in Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Virol.* 62, 902–911.
135. Gloghini, A., Dolcetti, R., and Carbone, A. (2013). Lymphomas occurring specifically in HIV-infected patients: from pathogenesis to pathology. *Semin. Cancer Biol.* 23, 457–467.
136. Gödde-Salz, E., Feller, A.C., and Lennert, K. (1987). Chromosomal abnormalities in lymphogranulomatosis X (LgrX)/angioimmunoblastic lymphadenopathy (AILD). *Leuk. Res.* 11, 181–190.
137. Godfrey, D.I., Kennedy, J., Suda, T., and Zlotnik, A. (2012). Pillars article: a developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3-CD4-CD8- triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD25 expression. *J. Immunol.* 193, 4244–4252. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 189, 4203–4211.
138. Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255–262.
139. Gong, Q., Wang, C., Rohr, J., Feldman, A.L., Chan, W.C., and McKeithan, T.W. (2016). Comment on: Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T-cell lymphoma, by Yoo et al. *Haematologica* 101, e269-270.
140. Gosselin, J., Menezes, J., D’Addario, M., Hiscott, J., Flamand, L., Lamoureux, G., and Oth, D. (1991). Inhibition of tumor necrosis factor- α transcription by Epstein-Barr virus. *Eur. J. Immunol.* 21, 203–208.
141. Gottschalk, S., Rooney, C.M., and Heslop, H.E. (2005). Post-transplant lymphoproliferative disorders. *Annu. Rev. Med.* 56, 29–44.
142. Gradoville, L., Kwa, D., El-Guindy, A., and Miller, G. (2002). Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virol.* 76, 5612–5626.
143. Greenspan, J.S., and Greenspan, D. (1989). Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 67, 396–403.
144. Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515–548.
145. Greifenegger, N., Jäger, M., Kunz-Schughart, L.A., Wolf, H., and Schwarzmann, F. (1998). Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: differential regulation during lytic viral replication. *J. Virol.* 72, 9323–9328.

146. Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., and Miller, G. (1987). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *84*, 1332–1336.
147. Grogg, K.L., Attygalle, A.D., Attygale, A.D., Macon, W.R., Remstein, E.D., Kurtin, P.J., and Dogan, A. (2006). Expression of CXCL13, a chemokine highly upregulated in germinal center T-helper cells, distinguishes angioimmunoblastic T-cell lymphoma from peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* *19*, 1101–1107.
148. Groux, H., Cottrez, F., Montpellier, C., Quatannens, B., Coll, J., Stehelin, D., and Auriault, C. (1997). Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood* *89*, 4521–4530.
149. Gru, A.A., Haverkos, B.H., Freud, A.G., Hastings, J., Nowacki, N.B., Barrionuevo, C., Vigil, C.E., Rochford, R., Natkunam, Y., Baiocchi, R.A., et al. (2015). The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* *10*, 456–467.
150. Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S.A., Gastaldello, S., and Masucci, M.G. (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 2313–2318.
151. Grundhoff, A.T., Kremmer, E., Türeci, O., Glieden, A., Gindorf, C., Atz, J., Mueller-Lantzsch, N., Schubach, W.H., and Grässer, F.A. (1999). Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J. Biol. Chem.* *274*, 19136–19144.
152. Grywalska, E., and Rolinski, J. (2015). Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Semin. Oncol.* *42*, 291–303.
153. Gunvén, P., Klein, G., Henle, G., Henle, W., and Clifford, P. (1970). Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma. Antibodies to EBV associated membrane and viral capsid antigens in Burkitt lymphoma patients. *Nature* *228*, 1053–1056.

H

154. Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* *55*, 427–433.
155. Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* *340*, 393–397.
156. Harada, S., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* *71*, 6611–6618.
157. Harold, C., Cox, D., and Riley, K.J. (2016). Epstein-Barr viral microRNAs target caspase 3. *Virol. J.* *13*, 145.
158. Harris, N.L., Jaffe, E.S., Stein, H., Banks, P.M., Chan, J.K., Cleary, M.L., Delsol, G., De Wolf-Peeters, C., Falini, B., and Gatter, K.C. (1994). A revised European-American

classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84, 1361–1392.

159. Hart, D.N., Baker, B.W., Inglis, M.J., Nimmo, J.C., Starling, G.C., Deacon, E., Rowe, M., and Beard, M.E. (1992). Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells. *Blood* 79, 2116–2123.
160. zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* 228, 1056–1058.
161. Hayashi, K., Jin, Z., Onoda, S., Joko, H., Teramoto, N., Ohara, N., Oda, W., Tanaka, T., Liu, Y.-X., Koirala, T.R., et al. (2003). Rabbit model for human EBV-associated hemophagocytic syndrome (HPS): sequential autopsy analysis and characterization of IL-2-dependent cell lines established from herpesvirus papio-induced fatal rabbit lymphoproliferative diseases with HPS. *Am. J. Pathol.* 162, 1721–1736.
162. He, J., Tang, F., Liu, L., Chen, L., Li, J., Ou, D., Zhang, L., Li, Z., Feng, D., Li, W., et al. (2016). Positive regulation of TAZ expression by EBV-LMP1 contributes to cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* 8, 52333–52344.
163. Henkel, T., Ling, P.D., Hayward, S.D., and Peterson, M.G. (1994). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA2 transactivation by recombination signal-binding protein J kappa. *Science* 265, 92–95.
164. Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. (1968). Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 59, 94–101.
165. Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., and Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157, 1064–1065.
166. Hennessy, K., and Kieff, E. (1983). One of two Epstein-Barr virus nuclear antigens contains a glycine-alanine copolymer domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 5665–5669.
167. Hennessy, K., Fennewald, S., Hummel, M., Cole, T., and Kieff, E. (1984). A membrane protein encoded by Epstein-Barr virus in latent growth-transforming infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81, 7207–7211.
168. Hennessy, K., Wang, F., Bushman, E.W., and Kieff, E. (1986). Definitive identification of a member of the Epstein-Barr virus nuclear protein 3 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 5693–5697.
169. Hermine, O., Lefrère, F., Bronowicki, J.-P., Mariette, X., Jondeau, K., Eclache-Saudreau, V., Delmas, B., Valensi, F., Cacoub, P., Brechot, C., et al. (2002). Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 89–94.
170. Higgins, C.D., Swerdlow, A.J., Macsween, K.F., Harrison, N., Williams, H., McAulay, K., Thomas, R., Reid, S., Conacher, M., Britton, K., et al. (2007). A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. *J. Infect. Dis.* 195, 474–482.

171. Higuchi, M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4675–4680.
172. Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K.M. (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* *76*, 455–459.
173. Hildesheim, A., and Wang, C.-P. (2012). Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies, 2000-2011: Rosetta Stone for NPC: genetics, viral infection, and other environmental factors. *Semin. Cancer Biol.* *22*, 107–116.
174. Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I., and Griffin, B.E. (1989). EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* *8*, 2639–2651.
175. Hjalgrim, H., Friborg, J., and Melbye, M. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
176. Hochberg, D., Souza, T., Catalina, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D.A. (2004). Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J. Virol.* *78*, 5194–5204.
177. Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavölgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, K.I. (1999). Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* *93*, 3956–3963.
178. Hömig-Hölzel, C., Hojer, C., Rastelli, J., Casola, S., Strobl, L.J., Müller, W., Quintanilla-Martinez, L., Gewies, A., Ruland, J., Rajewsky, K., et al. (2008). Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J. Exp. Med.* *205*, 1317–1329.
179. Horvath, G.C., and Schubach, W.H. (1993). Identification of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivation domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *191*, 196–200.
180. Horwitz, S.M., Zelenetz, A.D., Gordon, L.I., Wierda, W.G., Abramson, J.S., Advani, R.H., Andreadis, C.B., Bartlett, N., Byrd, J.C., Fayad, L.E., et al. (2016). NCCN Guidelines Insights: Non-Hodgkin's Lymphomas, Version 3.2016. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* *14*, 1067–1079.
181. Hoshino, Y., Morishima, T., Kimura, H., Nishikawa, K., Tsurumi, T., and Kuzushima, K. (1999). Antigen-driven expansion and contraction of CD8+-activated T cells in primary EBV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 5735–5740.
182. Howe, J.G., and Shu, M.D. (1988). Isolation and characterization of the genes for two small RNAs of herpesvirus papio and their comparison with Epstein-Barr virus-encoded EBER RNAs. *J. Virol.* *62*, 2790–2798.

183. Hsu, S.M., Waldron, J.A., Fink, L., King, C., Xie, S.S., Mansouri, A., and Barlogie, B. (1993). Pathogenic significance of interleukin-6 in angioimmunoblastic lymphadenopathy-type T-cell lymphoma. *Hum. Pathol.* 24, 126–131.
 184. Hu, L., Troyanovsky, B., Zhang, X., Trivedi, P., Ernberg, I., and Klein, G. (2000). Differences in the immunogenicity of latent membrane protein 1 (LMP1) encoded by Epstein-Barr virus genomes derived from LMP1-positive and -negative nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 60, 5589–5593.
 185. Huang, J., Zhang, P.-H., Gao, Y.-H., and Qiu, L.-G. (2012). Sequential development of diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Diagn. Cytopathol.* 40, 346–351.
 186. Huen, D.S., Henderson, S.A., Croom-Carter, D., and Rowe, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* 10, 549–560.
 187. Hummel, M., Thorley-Lawson, D., and Kieff, E. (1984). An Epstein-Barr virus DNA fragment encodes messages for the two major envelope glycoproteins (gp350/300 and gp220/200). *J. Virol.* 49, 413–417.
 188. Huppmann, A.R., Roulet, M.R., Raffeld, M., and Jaffe, E.S. (2013). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma partially obscured by an Epstein-Barr virus-negative clonal plasma cell proliferation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 31, e28-30.
 189. Huret, J.L., Senon, S., Bernheim, A., and Dessen, P. (2004). An Atlas on genes and chromosomes in oncology and haematology. *Cell. Mol. Biol. Noisy-Gd. Fr.* 50, 805–807.
 190. Hutchings, I.A., Tierney, R.J., Kelly, G.L., Stylianou, J., Rickinson, A.B., and Bell, A.I. (2006). Methylation status of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI W latent cycle promoter and promoter activity: analysis with novel EBV-positive Burkitt and lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 80, 10700–10711.
- !
191. Iannitto, E., Ferreri, A.J.M., Minardi, V., Tripodo, C., and Kreipe, H.H. (2008). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68, 264–271.
 192. Iliaza, H., Wulff, B.-E., Alla, N.R., Maragkakis, M., Megraw, M., Hatzigeorgiou, A., Iwakiri, D., Takada, K., Wiedmer, A., Showe, L., et al. (2010). Editing of Epstein-Barr virus-encoded BART6 microRNAs controls their dicer targeting and consequently affects viral latency. *J. Biol. Chem.* 285, 33358–33370.
 193. Incrocci, R., McCormack, M., and Swanson-Mungerson, M. (2013). Epstein-Barr virus LMP2A increases IL-10 production in mitogen-stimulated primary B-cells and B-cell lymphomas. *J. Gen. Virol.* 94, 1127–1133.
 194. Iqbal, J., Weisenburger, D.D., Greiner, T.C., Vose, J.M., McKeithan, T., Kucuk, C., Geng, H., Deffenbacher, K., Smith, L., Dybkaer, K., et al. (2010). Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 115, 1026–1036.

195. Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., and Oshimi, K. (2004). Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res.* *64*, 2167–2174.
 196. Isobe, Y., Sugimoto, K., Matsuura, I., Takada, K., and Oshimi, K. (2008). Epstein-Barr virus renders the infected natural killer cell line, NKL resistant to doxorubicin-induced apoptosis. *Br. J. Cancer* *99*, 1816–1822.
 197. Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
 198. Iwakiri, D. (2014). Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers* *6*, 1615–1630.
 199. Iwakiri, D., and Takada, K. (2010). Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. *Adv. Cancer Res.* *107*, 119–136.
 200. Iwakiri, D., Eizuru, Y., Tokunaga, M., and Takada, K. (2003). Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer Res.* *63*, 7062–7067.
 201. Izumi, K.M., Kaye, K.M., and Kieff, E.D. (1994a). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *68*, 4369–4376.
 202. Izumi, K.M., Kaye, K.M., and Kieff, E.D. (1994b). Epstein-Barr virus recombinant molecular genetic analysis of the LMP1 amino-terminal cytoplasmic domain reveals a probable structural role, with no component essential for primary B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* *68*, 4369–4376.
 203. Izumi, K.M., Kaye, K.M., and Kieff, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 1447–1452.
 204. Izumi, K.M., Cahir McFarland, E.D., Ting, A.T., Riley, E.A., Seed, B., and Kieff, E.D. (1999). The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5759–5767.
- ↓
205. Jaffe, E.S. (2006). Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 317–322.
 206. Jaffe, E.S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 523–531.
 207. Jaffe, E.S., and Wilson, W.H. (1997). Lymphomatoid granulomatosis: pathogenesis, pathology and clinical implications. *Cancer Surv.* *30*, 233–248.

208. Jenkins, M.K., Khoruts, A., Ingulli, E., Mueller, D.L., McSorley, S.J., Reinhardt, R.L., Itano, A., and Pape, K.A. (2001). In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 23–45.
209. Johannsen, E., Miller, C.L., Grossman, S.R., and Kieff, E. (1996). EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J. Virol.* 70, 4179–4183.
210. Johannsen, E., Luftig, M., Chase, M.R., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., and Kieff, E. (2004). Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 16286–16291.
211. Johansen, L.M., Deppmann, C.D., Erickson, K.D., Coffin, W.F., Thornton, T.M., Humphrey, S.E., Martin, J.M., and Taparowsky, E.J. (2003). EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J. Virol.* 77, 6029–6040.
212. Jones, C.H., Hayward, S.D., and Rawlins, D.R. (1989). Interaction of the lymphocyte-derived Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-1 with its DNA-binding sites. *J. Virol.* 63, 101–110.
213. Jung, Y.-J., Choi, H., Kim, H., and Lee, S.K. (2014). MicroRNA miR-BART20-5p stabilizes Epstein-Barr latency by directly targeting BZLF1 and BRLF1. *J. Virol.* 88, 9027–9037.

K

214. Kamranvar, S.A., and Masucci, M.G. (2011). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia* 25, 1017–1025.
215. Kanegane, H., Yachie, A., Miyawaki, T., and Tosato, G. (1998). EBV-NK cells interactions and lymphoproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma* 29, 491–498.
216. Kaneko, T., Fukuda, J., Yoshihara, T., Zheng, H., Mori, S., Mizoguchi, H., and Oshimi, K. (1995). Nasal natural killer (NK) cell lymphoma: report of a case with activated NK cells containing Epstein-Barr virus and expressing CD21 antigen, and comparative studies of their phenotype and cytotoxicity with normal NK cells. *Br. J. Haematol.* 91, 355–361.
217. Kaneko, Y., Larson, R.A., Variakojis, D., Haren, J.M., and Rowley, J.D. (1982). Nonrandom chromosome abnormalities in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Blood* 60, 877–887.
218. Kang, M.-S., and Kieff, E. (2015). Epstein-Barr virus latent genes. *Exp. Mol. Med.* 47, e131.
219. Karran, L., Gao, Y., Smith, P.R., and Griffin, B.E. (1992). Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 8058–8062.
220. Kasahara, Y., and Yachie, A. (2002). Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44, 283–294.

221. Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., and Szekely, L. (2003). EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int. J. Cancer* *105*, 644–653.
222. Kato, K., Yokoyama, A., Tohya, Y., Akashi, H., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y. (2003). Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein at serine-35, which regulates its coactivator function. *J. Gen. Virol.* *84*, 3381–3392.
223. Kaye, K.M., Izumi, K.M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 9150–9154.
224. Kaykas, A., and Sugden, B. (2000). The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* *19*, 1400–1410.
225. Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* *8*, 1098–1104.
226. Kelly, G.L., Milner, A.E., Tierney, R.J., Croom-Carter, D.S.G., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A.I., and Rickinson, A.B. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J. Virol.* *79*, 10709–10717.
227. Kennedy, G., and Sugden, B. (2003). EBNA-1, a bifunctional transcriptional activator. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6901–6908.
228. Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 14269–14274.
229. Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2014). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* *26*, 60–68.
230. Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., and Kinoshita, T. (1988). Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* *333*, 455–457.
231. Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J.* *17*, 1700–1709.
232. Kim, C.H., Pelus, L.M., White, J.R., and Broxmeyer, H.E. (1998). Differential chemotactic behavior of developing T cells in response to thymic chemokines. *Blood* *91*, 4434–4443.
233. Kim, J.G., Sohn, S.K., Chae, Y.S., Cho, Y.Y., Yang, D.H., Lee, J.-J., Kim, H.-J., Shin, H.J., Chung, J.S., Cho, G.J., et al. (2007). Alemtuzumab plus CHOP as front-line chemotherapy for

patients with peripheral T-cell lymphomas: a phase II study. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 60, 129–134.

234. Kim, J.H., Kim, W.S., Hong, J.Y., Ryu, K.J., Kim, S.J., and Park, C. (2017). Epstein-Barr virus EBNA2 directs doxorubicin resistance of B cell lymphoma through CCL3 and CCL4-mediated activation of NF- κ B and Btk. *Oncotarget* 8, 5361–5370.
235. Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., et al. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 19, 6742–6750.
236. Klinke, O., Feederle, R., and Delecluse, H.-J. (2014). Genetics of Epstein-Barr virus microRNAs. *Semin. Cancer Biol.* 26, 52–59.
237. Knecht, H., Bachmann, E., Brousset, P., Sandvej, K., Nadal, D., Bachmann, F., Odermatt, B.F., Delsol, G., and Pallesen, G. (1993). Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 82, 2937–2942.
238. Ko, Y.-H. (2015). EBV and human cancer. *Exp. Mol. Med.* 47, e130.
239. Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J. Virol.* 73, 9827–9831.
240. Konstantinou, K., Yamamoto, K., Ishibashi, F., Mizoguchi, Y., Kurata, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Sawabe, M., Ohta, M., Miyakoshi, S., et al. (2009). Angiogenic mediators of the angiopoietin system are highly expressed by CD10-positive lymphoma cells in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 144, 696–704.
241. Küppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 801–812.
242. Küppers, R. (2009). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 491–496.
243. Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 149–159.
244. Kuzembayeva, M., Hayes, M., and Sugden, B. (2014). Multiple functions are mediated by the miRNAs of Epstein-Barr virus. *Curr. Opin. Virol.* 7, 61–65.
245. Kwong, Y.-L. (2005). Natural killer-cell malignancies: diagnosis and treatment. *Leukemia* 19, 2186–2194.
246. Kyriakou, C., Canals, C., Goldstone, A., Caballero, D., Metzner, B., Kobbe, G., Kolb, H.-J., Kienast, J., Reimer, P., Finke, J., et al. (2008). High-dose therapy and autologous stem-cell transplantation in angioimmunoblastic lymphoma: complete remission at transplantation is the major determinant of Outcome-Lymphoma Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 218–224.

247. Lachenal, F. (2007). [Angioimmunoblastic T-cell lymphoma]. *Presse Medicale Paris Fr.* 1983 36, 1655–1662.
248. Laherty, C.D., Hu, H.M., Opipari, A.W., Wang, F., and Dixit, V.M. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J. Biol. Chem.* 267, 24157–24160.
249. Laichalk, L.L., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* 79, 1296–1307.
250. Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D., and Gosselin, J. (1998). Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* 92, 291–299.
251. Lee, J.M., Lee, K.-H., Weidner, M., Osborne, B.A., and Hayward, S.D. (2002). Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77- mediated apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 11878–11883.
252. Lee, N., Harris, J., Garden, A.S., Straube, W., Glisson, B., Xia, P., Bosch, W., Morrison, W.H., Quivey, J., Thorstad, W., et al. (2009). Intensity-modulated radiation therapy with or without chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma: radiation therapy oncology group phase II trial 0225. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 3684–3690.
253. Lee, S.H., Kim, J.S., Kim, J., Kim, S.J., Kim, W.S., Lee, S., Ko, Y.H., and Yoo, H.Y. (2015). A highly recurrent novel missense mutation in CD28 among angioimmunoblastic T-cell lymphoma patients. *Haematologica* 100, e505-507.
254. Lee, S.-S., Rüdiger, T., Odenwald, T., Roth, S., Starostik, P., and Müller-Hermelink, H.K. (2003). Angioimmunoblastic T cell lymphoma is derived from mature T-helper cells with varying expression and loss of detectable CD4. *Int. J. Cancer* 103, 12–20.
255. Leight, E.R., and Sugden, B. (2000). EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* 10, 83–100.
256. Lemonnier, F., Couronné, L., Parrens, M., Jaïs, J.-P., Travert, M., Lamant, L., Tournillac, O., Rousset, T., Fabiani, B., Cairns, R.A., et al. (2012). Recurrent TET2 mutations in peripheral T-cell lymphomas correlate with TFH-like features and adverse clinical parameters. *Blood* 120, 1466–1469.
257. Lennert, K. (1979). [Nature, prognosis and nomenclature of angioimmunoblastic (lymphadenopathy (lymphogranulomatosis X or T-zone lymphoma)]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1946 104, 1246–1247.
258. Lenze, D., Leoncini, L., Hummel, M., Volinia, S., Liu, C.G., Amato, T., De Falco, G., Githanga, J., Horn, H., Nyagol, J., et al. (2011). The different epidemiologic subtypes of Burkitt lymphoma share a homogenous micro RNA profile distinct from diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia* 25, 1869–1876.
259. Lepretre, S., Buchonnet, G., Stamatoullas, A., Lenain, P., Duval, C., d'Anjou, J., Callat, M.P., Tilly, H., and Bastard, C. (2000). Chromosome abnormalities in peripheral T-cell lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 117, 71–79.

260. Leroy, B., Gillet, L., Vanderplasschen, A., and Wattiez, R. (2016). Structural Proteomics of Herpesviruses. *Viruses* 8.
261. de Leval, L., and Gaulard, P. (2008). Pathobiology and molecular profiling of peripheral T-cell lymphomas. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program* 272–279.
262. de Leval, L., Rickman, D.S., Thielen, C., Reynies, A. de, Huang, Y.-L., Delsol, G., Lamant, L., Leroy, K., Brière, J., Molina, T., et al. (2007). The gene expression profile of nodal peripheral T-cell lymphoma demonstrates a molecular link between angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) and follicular helper T (TFH) cells. *Blood* 109, 4952–4963.
263. de Leval, L., Gisselbrecht, C., and Gaulard, P. (2010). Advances in the understanding and management of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 148, 673–689.
264. Levine, P.H., Pallesen, G., Ebbesen, P., Harris, N., Evans, A.S., and Müeller, N. (1994). Evaluation of Epstein-Barr virus antibody patterns and detection of viral markers in the biopsies of patients with Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* 59, 48–50.
265. Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, P.M., Klein, G., Kurilla, M.G., and Masucci, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685–688.
266. Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12616–12621.
267. Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15–20.
268. Li, X., Babayi, A., Sang, W., Abulajiang, G., Li, Q., Cui, W., and Zhang, W. (2014). Clinicopathologic, immunophenotypic, and EBER in situ hybridization study of extranodal natural killer/T-cell lymphoma, nasal type in multi-ethnic groups. *Clin. Lab.* 60, 419–425.
269. Li, Z., Zhang, Y., and Sun, B. (2011). Current understanding of Th2 cell differentiation and function. *Protein Cell* 2, 604–611.
270. Lighvani, A.A., Frucht, D.M., Jankovic, D., Yamane, H., Aliberti, J., Hissong, B.D., Nguyen, B.V., Gadina, M., Sher, A., Paul, W.E., et al. (2001). T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15137–15142.
271. Lin, M.-C., Lin, Y.-C., Chen, S.-T., Young, T.-H., and Lou, P.-J. (2017). Therapeutic vaccine targeting Epstein-Barr virus latent protein, LMP1, suppresses LMP1-expressing tumor growth and metastasis in vivo. *BMC Cancer* 17, 18.
272. Lind, E.F., Prockop, S.E., Porritt, H.E., and Petrie, H.T. (2001). Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development. *J. Exp. Med.* 194, 127–134.

273. Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M.L., and de Groot, C. (1994). Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J. Exp. Med.* 179, 1173–1184.
274. Ling, P.D., Hsieh, J.J., Ruf, I.K., Rawlins, D.R., and Hayward, S.D. (1994). EBNA-2 upregulation of Epstein-Barr virus latency promoters and the cellular CD23 promoter utilizes a common targeting intermediate, CBF1. *J. Virol.* 68, 5375–5383.
275. Ling, P.D., Peng, R.S., Nakajima, A., Yu, J.H., Tan, J., Moses, S.M., Yang, W.-H., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, K.D., et al. (2005). Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24, 3565–3575.
276. Linterman, M.A., Beaton, L., Yu, D., Ramiscal, R.R., Srivastava, M., Hogan, J.J., Verma, N.K., Smyth, M.J., Rigby, R.J., and Vinuesa, C.G. (2010). IL-21 acts directly on B cells to regulate Bcl-6 expression and germinal center responses. *J. Exp. Med.* 207, 353–363.
277. Lipford, E.H., Smith, H.R., Pittaluga, S., Jaffe, E.S., Steinberg, A.D., and Cossman, J. (1987). Clonality of angioimmunoblastic lymphadenopathy and implications for its evolution to malignant lymphoma. *J. Clin. Invest.* 79, 637–642.
278. Liu, P., Fang, X., Feng, Z., Guo, Y.-M., Peng, R.-J., Liu, T., Huang, Z., Feng, Y., Sun, X., Xiong, Z., et al. (2011). Direct sequencing and characterization of a clinical isolate of Epstein-Barr virus from nasopharyngeal carcinoma tissue by using next-generation sequencing technology. *J. Virol.* 85, 11291–11299.
279. Lo, Y.M. (2001). Prognostic implication of pretreatment plasma/serum concentration of Epstein-Barr virus DNA in nasopharyngeal carcinoma. *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother.* 55, 362–365.
280. Lo, A.K.F., To, K.F., Lo, K.W., Lung, R.W.M., Hui, J.W.Y., Liao, G., and Hayward, S.D. (2007). Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 16164–16169.
281. Lo, K.W., To, K.F., and Huang, D.P. (2004). Focus on nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Cell* 5, 423–428.
282. Lome-Maldonado, C., Canioni, D., Hermine, O., Delabesse, E., Damotte, D., Raffoux, E., Gaulard, P., Macintyre, E., Brousse, N., and French Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) (2002). Angio-immunoblastic T cell lymphoma (AILD-TL) rich in large B cells and associated with Epstein-Barr virus infection. A different subtype of AILD-TL? *Leukemia* 16, 2134–2141.
283. Long, H.M., Haigh, T.A., Gudgeon, N.H., Leen, A.M., Tsang, C.-W., Brooks, J., Landais, E., Houssaint, E., Lee, S.P., Rickinson, A.B., et al. (2005). CD4+ T-cell responses to Epstein-Barr virus (EBV) latent-cycle antigens and the recognition of EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* 79, 4896–4907.
284. Longnecker, R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv. Cancer Res.* 79, 175–200.
285. Lu, J., Murakami, M., Verma, S.C., Cai, Q., Haldar, S., Kaul, R., Wasik, M.A., Middeldorp, J., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1)

confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology* 410, 64–75.

286. Luckheeram, R.V., Zhou, R., Verma, A.D., and Xia, B. (2012). CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.* 2012, 925135.
287. Luka, J., Miller, G., Jörnvall, H., and Pearson, G.R. (1986). Characterization of the restricted component of Epstein-Barr virus early antigens as a cytoplasmic filamentous protein. *J. Virol.* 58, 748–756.
288. Lukes, R.J., and Tindle, B.H. (1975). Immunoblastic lymphadenopathy. A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 292, 1–8.
289. Lung, R.W.-M., Tong, J.H.-M., Sung, Y.-M., Leung, P.-S., Ng, D.C.-H., Chau, S.-L., Chan, A.W.-H., Ng, E.K.-O., Lo, K.-W., and To, K.-F. (2009). Modulation of LMP2A expression by a newly identified Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART22. *Neoplasia N. Y. N* 11, 1174–1184.
290. Luzuriaga, K., and Sullivan, J.L. (2010). Infectious mononucleosis. *N. Engl. J. Med.* 362, 1993–2000.

M

291. Macsween, K.F., Higgins, C.D., McAulay, K.A., Williams, H., Harrison, N., Swerdlow, A.J., and Crawford, D.H. (2010). Infectious mononucleosis in university students in the United kingdom: evaluation of the clinical features and consequences of the disease. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 699–706.
292. Magaki, S., Ostrzega, N., Ho, E., Yim, C., Wu, P., and Vinters, H.V. (2017). Hemophagocytic lymphohistiocytosis associated with Epstein-Barr virus in the central nervous system. *Hum. Pathol.* 59, 108–112.
293. Mahadevan, D., Unger, J.M., Spier, C.M., Persky, D.O., Young, F., LeBlanc, M., Fisher, R.I., and Miller, T.P. (2013). Phase 2 trial of combined cisplatin, etoposide, gemcitabine, and methylprednisolone (PEGS) in peripheral T-cell non-Hodgkin lymphoma: Southwest Oncology Group Study S0350. *Cancer* 119, 371–379.
294. Maki, D.G., and Reich, R.M. (1982). Infectious mononucleosis in the athlete. Diagnosis, complications, and management. *Am. J. Sports Med.* 10, 162–173.
295. Mancao, C., and Hammerschmidt, W. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110, 3715–3721.
296. Mannick, J.B., Cohen, J.I., Birkenbach, M., Marchini, A., and Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* 65, 6826–6837.
297. Manso, R., Sánchez-Beato, M., Monsalvo, S., Gómez, S., Cereceda, L., Llamas, P., Rojo, F., Mollejo, M., Menárguez, J., Alves, J., et al. (2014). The RHOA G17V gene mutation occurs frequently in peripheral T-cell lymphoma and is associated with a characteristic molecular signature. *Blood* 123, 2893–2894.

298. Mao, Y., Lu, M.P., Lin, H., Zhang, D.W., Liu, Y., Li, Q.D., Lv, Z.G., Xu, J.R., Chen, R.J., and Zhu, J. (2013). Prognostic significance of EBV latent membrane protein 1 expression in lymphomas: evidence from 15 studies. *PloS One* 8, e60313.
299. Marafioti, T., Paterson, J.C., Ballabio, E., Chott, A., Natkunam, Y., Rodriguez-Justo, M., Plonquet, A., Rodriguez-Pinilla, S.M., Klapper, W., Hansmann, M.-L., et al. (2010). The inducible T-cell co-stimulator molecule is expressed on subsets of T cells and is a new marker of lymphomas of T follicular helper cell-derivation. *Haematologica* 95, 432–439.
300. Marquitz, A.R., and Raab-Traub, N. (2012). The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin. Cancer Biol.* 22, 166–172.
301. Marquitz, A.R., Mathur, A., Edwards, R.H., and Raab-Traub, N. (2015). Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI A Rightward Transcript Region. *J. Virol.* 89, 11256–11268.
302. Martel, P., Laroche, L., Courville, P., Larroche, C., Wechsler, J., Lenormand, B., Delfau, M.H., Bodemer, C., Bagot, M., and Joly, P. (2000). Cutaneous involvement in patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia: a clinical, immunohistological, and molecular analysis. *Arch. Dermatol.* 136, 881–886.
303. Matsuo, T., Heller, M., Petti, L., O'Shiro, E., and Kieff, E. (1984). Persistence of the entire Epstein-Barr virus genome integrated into human lymphocyte DNA. *Science* 226, 1322–1325.
304. McAulay, K.A., Higgins, C.D., Macsween, K.F., Lake, A., Jarrett, R.F., Robertson, F.L., Williams, H., and Crawford, D.H. (2007). HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J. Clin. Invest.* 117, 3042–3048.
305. McClain, K.L., Leach, C.T., Jenson, H.B., Joshi, V.V., Pollock, B.H., Parmley, R.T., DiCarlo, F.J., Chadwick, E.G., and Murphy, S.B. (1995). Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in young people with AIDS. *N. Engl. J. Med.* 332, 12–18.
306. McHeyzer-Williams, L.J., Pelletier, N., Mark, L., Fazilleau, N., and McHeyzer-Williams, M.G. (2009). Follicular helper T cells as cognate regulators of B cell immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 266–273.
307. Mesri, E.A., Feitelson, M.A., and Munger, K. (2014). Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe* 15, 266–282.
308. Meyohas, M.C., Maréchal, V., Desire, N., Bouillie, J., Frottier, J., and Nicolas, J.C. (1996). Study of mother-to-child Epstein-Barr virus transmission by means of nested PCRs. *J. Virol.* 70, 6816–6819.
309. Miller, G. (1974). The oncogenicity of Epstein-Barr virus. *J. Infect. Dis.* 130, 187–205.
310. Miller, N., and Hutt-Fletcher, L.M. (1992). Epstein-Barr virus enters B cells and epithelial cells by different routes. *J. Virol.* 66, 3409–3414.

311. Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *69*, 383–387.
312. Miller, W.E., Edwards, R.H., Walling, D.M., and Raab-Traub, N. (1994). Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J. Gen. Virol.* *75* (Pt 10), 2729–2740.
313. Miyashita, E.M., Yang, B., Babcock, G.J., and Thorley-Lawson, D.A. (1997). Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J. Virol.* *71*, 4882–4891.
314. Molesworth, S.J., Lake, C.M., Borza, C.M., Turk, S.M., and Hutt-Fletcher, L.M. (2000). Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.* *74*, 6324–6332.
315. Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R.S., Herrup, K., Tonegawa, S., and Papaioannou, V.E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* *68*, 869–877.
316. Montpellier, C., Crepieux, P., Quatannens, B., Delobel, B., Croquette, M., Stehelin, D., Auriault, C., Groux, H., and Coll, J. (1997). Homologous T and B cells immortalized in vitro by the Epstein-Barr virus exhibit differential genetical and functional features. *Int. J. Oncol.* *11*, 87–96.
317. Morris, M.A., Dawson, C.W., Laverick, L., Davis, A.M., Dudman, J.P.R., Raveenthiraraj, S., Ahmad, Z., Yap, L.-F., and Young, L.S. (2016). The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF β and β 1 integrin signalling. *Sci. Rep.* *6*, 19533.
318. Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* *80*, 389–399.
319. Moss, W.N., Lee, N., Pimienta, G., and Steitz, J.A. (2014). RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biol.* *11*, 10–17.
320. Mourad, N., Mounier, N., Brière, J., Raffoux, E., Delmer, A., Feller, A., Meijer, C.J.L.M., Emile, J.-F., Bouabdallah, R., Bosly, A., et al. (2008). Clinical, biologic, and pathologic features in 157 patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma treated within the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA) trials. *Blood* *111*, 4463–4470.
321. Mueller, N.E., Lennette, E.T., Dupnik, K., and Birmann, B.M. (2012). Antibody titers against EBNA1 and EBNA2 in relation to Hodgkin lymphoma and history of infectious mononucleosis. *Int. J. Cancer* *130*, 2886–2891.
322. Murono, S., Yoshizaki, T., Sato, H., Takeshita, H., Furukawa, M., and Pagano, J.S. (2000). Aspirin inhibits tumor cell invasiveness induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 through suppression of matrix metalloproteinase-9 expression. *Cancer Res.* *60*, 2555–2561.

323. Mutalima, N., Molyneux, E., Jaffe, H., Kamiza, S., Borgstein, E., Mkandawire, N., Liomba, G., Batumba, M., Lagos, D., Gratrix, F., et al. (2008). Associations between Burkitt lymphoma among children in Malawi and infection with HIV, EBV and malaria: results from a case-control study. *PloS One* 3, e2505.

N

324. Nagoshi, H., Kuroda, J., Kobayashi, T., Maegawa, S., Chinen, Y., Kiyota, M., Nakayama, R., Mizutani, S., Shimura, Y., Yamamoto-Sugitani, M., et al. (2013). Clinical manifestation of angioimmunoblastic T-cell lymphoma with exuberant plasmacytosis. *Int. J. Hematol.* 98, 366–374.
325. Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M.T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M.G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer* 57, 240–244.
326. Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K., and Yoshie, O. (2004). Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 78, 1665–1674.
327. Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K., and Takada, K. (2002). Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J.* 21, 954–965.
328. Nathwani, B.N., Rappaport, H., Moran, E.M., Pangalis, G.A., and Kim, H. (1978). Malignant lymphoma arising in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Cancer* 41, 578–606.
329. Nelson, M., Horsman, D.E., Weisenburger, D.D., Gascoyne, R.D., Dave, B.J., Loberiza, F.R., Ludkovski, O., Savage, K.J., Armitage, J.O., and Sanger, W.G. (2008). Cytogenetic abnormalities and clinical correlations in peripheral T-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 141, 461–469.
330. Nicolae, A., Pittaluga, S., Venkataraman, G., Vijnovich-Baron, A., Xi, L., Raffeld, M., and Jaffe, E.S. (2013). Peripheral T-cell lymphomas of follicular T-helper cell derivation with Hodgkin/Reed-Sternberg cells of B-cell lineage: both EBV-positive and EBV-negative variants exist. *Am. J. Surg. Pathol.* 37, 816–826.
331. Niedobitek, G., Agathangelou, A., Rowe, M., Jones, E.L., Jones, D.B., Turyaguma, P., Oryema, J., Wright, D.H., and Young, L.S. (1995). Heterogeneous expression of Epstein-Barr virus latent proteins in endemic Burkitt's lymphoma. *Blood* 86, 659–665.
332. Niens, M., Jarrett, R.F., Hepkema, B., Nolte, I.M., Diepstra, A., Platteel, M., Kouprie, N., Delury, C.P., Gallagher, A., Visser, L., et al. (2007). HLA-A*02 is associated with a reduced risk and HLA-A*01 with an increased risk of developing EBV+ Hodgkin lymphoma. *Blood* 110, 3310–3315.
333. Niino, D., Komohara, Y., Murayama, T., Aoki, R., Kimura, Y., Hashikawa, K., Kiyasu, J., Takeuchi, M., Suefuji, N., Sugita, Y., et al. (2010). Ratio of M2 macrophage expression is closely associated with poor prognosis for Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL). *Pathol. Int.* 60, 278–283.

334. Nishikawa, J., Yoshiyama, H., Iizasa, H., Kanehiro, Y., Nakamura, M., Nishimura, J., Saito, M., Okamoto, T., Sakai, K., Suehiro, Y., et al. (2014). Epstein-barr virus in gastric carcinoma. *Cancers* 6, 2259–2274.
335. Nitsche, F., Bell, A., and Rickinson, A. (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J. Virol.* 71, 6619–6628.

O

336. Odejide, O., Weigert, O., Lane, A.A., Toscano, D., Lunning, M.A., Kopp, N., Kim, S., van Bodegom, D., Bolla, S., Schatz, J.H., et al. (2014). A targeted mutational landscape of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Blood* 123, 1293–1296.
337. Ohashi, M., Holthaus, A.M., Calderwood, M.A., Lai, C.-Y., Krastins, B., Sarracino, D., and Johannsen, E. (2015). The EBNA3 family of Epstein-Barr virus nuclear proteins associates with the USP46/USP12 deubiquitination complexes to regulate lymphoblastoid cell line growth. *PLoS Pathog.* 11, e1004822.
338. Ohshima KHaraoka, S., Suzumiya, J., Kawasaki, C., Kanda, M., and Kikuchi, M. (2000). Cytoplasmic cytokines in lymphoproliferative disorders: multiple cytokine production in angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia. *Leuk. Lymphoma* 38, 541–545.
339. Ontiveros, E.P., Halwani, A., Stunz, L.L., Kamberos, N., Olivier, A.K., Janz, S., and Bishop, G.A. (2014). A new model of LMP1-MYC interaction in B cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 55, 2917–2923.
340. O’Shea, J.J., and Paul, W.E. (2010). Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 327, 1098–1102.
341. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N.K., Valdez, P.A., and Hymowitz, S.G. (2011). Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 71–109.
342. Owen, T.J., O’Neil, J.D., Dawson, C.W., Hu, C., Chen, X., Yao, Y., Wood, V.H.J., Mitchell, L.E., White, R.J., Young, L.S., et al. (2010). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Mol. Cancer* 9, 241.
343. Oyama, T., Yamamoto, K., Asano, N., Oshiro, A., Suzuki, R., Kagami, Y., Morishima, Y., Takeuchi, K., Izumo, T., Mori, S., et al. (2007). Age-related EBV-associated B-cell lymphoproliferative disorders constitute a distinct clinicopathologic group: a study of 96 patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 5124–5132.

P

344. Palomero, T., Couronné, L., Khiabani, H., Kim, M.-Y., Ambesi-Impiombato, A., Perez-Garcia, A., Carpenter, Z., Abate, F., Allegretta, M., Haydu, J.E., et al. (2014). Recurrent mutations in epigenetic regulators, RHOA and FYN kinase in peripheral T cell lymphomas. *Nat. Genet.* 46, 166–170.

345. Palser, A.L., Grayson, N.E., White, R.E., Corton, C., Correia, S., Ba Abdullah, M.M., Watson, S.J., Cotten, M., Arrand, J.R., Murray, P.G., et al. (2015). Genome diversity of Epstein-Barr virus from multiple tumor types and normal infection. *J. Virol.* **89**, 5222–5237.
346. Pandya, J., and Walling, D.M. (2006). Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *J. Virol.* **80**, 8038–8046.
347. Panousis, C.G., and Rowe, D.T. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2 associates with and is a substrate for mitogen-activated protein kinase. *J. Virol.* **71**, 4752–4760.
348. Papesch, M., and Watkins, R. (2001). Epstein-Barr virus infectious mononucleosis. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* **26**, 3–8.
349. Park, J.H., Na, S.Y., Lee, Y.J., Cho, E.W., and Kim, K.L. (2000). Downregulation of MHC class II expression by oxidant-induced apoptosis in EBV-transformed B-cells. *Mol. Cells* **10**, 654–661.
350. Park, S., Lee, J., Ko, Y.H., Han, A., Jun, H.J., Lee, S.C., Hwang, I.G., Park, Y.H., Ahn, J.S., Jung, C.W., et al. (2007). The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* **110**, 972–978.
351. Parker, G.A., Touitou, R., and Allday, M.J. (2000). Epstein-Barr virus EBNA3C can disrupt multiple cell cycle checkpoints and induce nuclear division divorced from cytokinesis. *Oncogene* **19**, 700–709.
352. Parsonnet, J., Hansen, S., Rodriguez, L., Gelb, A.B., Warnke, R.A., Jellum, E., Orentreich, N., Vogelman, J.H., and Friedman, G.D. (1994). *Helicobacter pylori* infection and gastric lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **330**, 1267–1271.
353. Patterson, R.L., van Rossum, D.B., Barrow, R.K., and Snyder, S.H. (2004). RACK1 binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and mediates Ca²⁺ release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2328–2332.
354. Pautier, P., Devidas, A., Delmer, A., Dombret, H., Sutton, L., Zini, J.M., Nedelec, G., Molina, T., Marolleau, J.P., and Brice, P. (1999). Angioimmunoblastic-like T-cell non Hodgkin's lymphoma: outcome after chemotherapy in 33 patients and review of the literature. *Leuk. Lymphoma* **32**, 545–552.
355. Peng, R., Moses, S.C., Tan, J., Kremmer, E., and Ling, P.D. (2005). The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J. Virol.* **79**, 4492–4505.
356. Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., Ware, C.B., et al. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *J. Exp. Med.* **180**, 1955–1960.
357. Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**, 734–736.

358. Piccaluga, P.P., Agostinelli, C., Califano, A., Carbone, A., Fantoni, L., Ferrari, S., Gazzola, A., Gloghini, A., Righi, S., Rossi, M., et al. (2007). Gene expression analysis of angioimmunoblastic lymphoma indicates derivation from T follicular helper cells and vascular endothelial growth factor deregulation. *Cancer Res.* 67, 10703–10710.
359. Piccaluga, P.P., Navari, M., De Falco, G., Ambrosio, M.R., Lazzi, S., Fuligni, F., Bellan, C., Rossi, M., Sapienza, M.R., Laginestra, M.A., et al. (2015). Virus-encoded microRNA contributes to the molecular profile of EBV-positive Burkitt lymphomas. *Oncotarget* 7, 224–240.
360. Pizzo, P.A., Magrath, I.T., Chattopadhyay, S.K., Biggar, R.J., and Gerber, P. (1978). A new tumour-derived transforming strain of Epstein-Barr virus. *Nature* 272, 629–631.
361. Pizzolo, G., Vinante, F., Agostini, C., Zambello, R., Trentin, L., Masciarelli, M., Chilosi, M., Benedetti, F., Dazzi, F., and Todeschini, G. (1987). Immunologic abnormalities in angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Cancer* 60, 2412–2418.
362. Pope, J.H., Horne, M.K., and Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int. J. Cancer* 3, 857–866.
363. Puel, A., Cypowyj, S., Bustamante, J., Wright, J.F., Liu, L., Lim, H.K., Migaud, M., Israel, L., Chrabieh, M., Audry, M., et al. (2011). Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science* 332, 65–68.
364. Puls, A., Eliopoulos, A.G., Nobes, C.D., Bridges, T., Young, L.S., and Hall, A. (1999). Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 17), 2983–2992.

Q

365. Quivoron, C., Couronné, L., Della Valle, V., Lopez, C.K., Plo, I., Wagner-Ballon, O., Do Cruzeiro, M., Delhommeau, F., Arnulf, B., Stern, M.-H., et al. (2011). TET2 inactivation results in pleiotropic hematopoietic abnormalities in mouse and is a recurrent event during human lymphomagenesis. *Cancer Cell* 20, 25–38.
366. Qiu, J., and Thorley-Lawson, D.A. (2014). EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 11157–11162.

R

367. Raab-Traub, N. (2002). Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin. Cancer Biol.* 12, 431–441.
368. Raab-Traub, N., and Flynn, K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* 47, 883–889.
369. Raab-Traub, N., Rajadurai, P., Flynn, K., and Lanier, A.P. (1991). Epstein-Barr virus infection in carcinoma of the salivary gland. *J. Virol.* 65, 7032–7036.

370. Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. (1982). Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J. Virol.* *44*, 834–844.
371. Radkov, S.A., Tuitou, R., Brehm, A., Rowe, M., West, M., Kouzarides, T., and Allday, M.J. (1999). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J. Virol.* *73*, 5688–5697.
372. Radtke, F., Wilson, A., Stark, G., Bauer, M., van Meerwijk, J., MacDonald, H.R., and Aguet, M. (1999). Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity* *10*, 547–558.
373. Ragoczy, T., Heston, L., and Miller, G. (1998). The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J. Virol.* *72*, 7978–7984.
374. Rawlins, D.R., Milman, G., Hayward, S.D., and Hayward, G.S. (1985). Sequence-specific DNA binding of the Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA-1) to clustered sites in the plasmid maintenance region. *Cell* *42*, 859–868.
375. Rechsteiner, M.P., Berger, C., Zauner, L., Sigrist, J.A., Weber, M., Longnecker, R., Bernasconi, M., and Nadal, D. (2008). Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J. Virol.* *82*, 1739–1747.
376. Ree, H.J., Kadin, M.E., Kikuchi, M., Ko, Y.H., Suzumiya, J., and Go, J.H. (1999). Bcl-6 expression in reactive follicular hyperplasia, follicular lymphoma, and angioimmunoblastic T-cell lymphoma with hyperplastic germinal centers: heterogeneity of intrafollicular T-cells and their altered distribution in the pathogenesis of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Hum. Pathol.* *30*, 403–411.
377. Reisman, D., and Sugden, B. (1986). trans activation of an Epstein-Barr viral transcriptional enhancer by the Epstein-Barr viral nuclear antigen 1. *Mol. Cell. Biol.* *6*, 3838–3846.
378. Rensing, M.E., van Gent, M., Gram, A.M., Hooykaas, M.J.G., Piersma, S.J., and Wiertz, E.J.H.J. (2015). Immune Evasion by Epstein-Barr Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* *391*, 355–381.
379. Revoltella, R.P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G., and Calef, E. (1989). Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J. Gen. Virol.* *70 (Pt 5)*, 1203–1215.
380. Rickinson, A.B. (2014). Co-infections, inflammation and oncogenesis: future directions for EBV research. *Semin. Cancer Biol.* *26*, 99–115.
381. Rickinson, A.B., Young, L.S., and Rowe, M. (1987). Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J. Virol.* *61*, 1310–1317.
382. Rickinson, A.B., Long, H.M., Palendira, U., Münz, C., and Hislop, A.D. (2014). Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* *35*, 159–169.

383. Robertson, E.S., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1994). An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J. Virol.* 68, 1449–1458.
384. Robertson, E.S., Grossman, S., Johannsen, E., Miller, C., Lin, J., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J. Virol.* 69, 3108–3116.
385. Robertson, E.S., Lin, J., and Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J. Virol.* 70, 3068–3074.
386. Rogatsch, H., Bonatti, H., Menet, A., Larcher, C., Feichtinger, H., and Dirnhofer, S. (2000). Epstein-Barr virus-associated multicentric leiomyosarcoma in an adult patient after heart transplantation: case report and review of the literature. *Am. J. Surg. Pathol.* 24, 614–621.
387. Rohr, J., Guo, S., Huo, J., Bouska, A., Lachel, C., Li, Y., Simone, P.D., Zhang, W., Gong, Q., Wang, C., et al. (2016). Recurrent activating mutations of CD28 in peripheral T-cell lymphomas. *Leukemia* 30, 1062–1070.
388. Roncador, G., García Verdes-Montenegro, J.-F., Tedoldi, S., Paterson, J.C., Klapper, W., Ballabio, E., Maestre, L., Pileri, S., Hansmann, M.-L., Piris, M.A., et al. (2007). Expression of two markers of germinal center T cells (SAP and PD-1) in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Haematologica* 92, 1059–1066.
389. Rosa, M.D., Gottlieb, E., Lerner, M.R., and Steitz, J.A. (1981). Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol. Cell. Biol.* 1, 785–796.
390. Roschewski, M., and Wilson, W.H. (2012). EBV-associated lymphomas in adults. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 25, 75–89.
391. Rowe, M., Young, L.S., Cadwallader, K., Petti, L., Kieff, E., and Rickinson, A.B. (1989). Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J. Virol.* 63, 1031–1039.
392. Rymo, L. (1979). Identification of transcribed regions of Epstein-Barr virus DNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J. Virol.* 32, 8–18.

S

393. Sadler, R.H., and Raab-Traub, N. (1995). Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J. Virol.* 69, 1132–1141.
394. Saha, A., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr virus Associated B-cell lymphomas: Pathogenesis and Clinical Outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17, 3056–3063.
395. Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., and Robertson, E.S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J. Virol.* 83, 4652–4669.

396. Saint-Ruf, C., Ungewiss, K., Groettrup, M., Bruno, L., Fehling, H.J., and von Boehmer, H. (2009). Analysis and expression of a cloned pre-T cell receptor gene. *Science*. 1994. 266: 1208-1212. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 182, 5165–5169.
397. Saito, M., Fukuda, T., Shiohara, T., and Homori, M. (2005). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: a relatively common type of T-cell lymphoma in Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* 23, 888–890.
398. Sakamoto, K., Sekizuka, T., Uehara, T., Hishima, T., Mine, S., Fukumoto, H., Sato, Y., Hasegawa, H., Kuroda, M., and Katano, H. (2017). Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med.* 6, 605–618.
399. Sakata-Yanagimoto, M., Enami, T., Yoshida, K., Shiraishi, Y., Ishii, R., Miyake, Y., Muto, H., Tsuyama, N., Sato-Otsubo, A., Okuno, Y., et al. (2014). Somatic RHOA mutation in angioimmunoblastic T cell lymphoma. *Nat. Genet.* 46, 171–175.
400. Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. (2008). Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27, 4150–4160.
401. Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* 64, 4084–4092.
402. Sample, J., Brooks, L., Sample, C., Young, L., Rowe, M., Gregory, C., Rickinson, A., and Kieff, E. (1991). Restricted Epstein-Barr virus protein expression in Burkitt lymphoma is due to a different Epstein-Barr nuclear antigen 1 transcriptional initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 6343–6347.
403. Sato, F., Ishida, T., Ito, A., Mori, F., Masaki, A., Takino, H., Narita, T., Ri, M., Kusumoto, S., Suzuki, S., et al. (2013). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma mice model. *Leuk. Res.* 37, 21–27.
404. Savard, M., Bélanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L., and Gosselin, J. (2000). Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74, 2612–2619.
405. Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995a). Redefining the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen EBNA-1 gene promoter and transcription initiation site in group I Burkitt lymphoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10565–10569.
406. Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1995b). The Epstein-Barr virus BamHI F promoter is an early lytic promoter: lack of correlation with EBNA 1 gene transcription in group 1 Burkitt's lymphoma cell lines. *J. Virol.* 69, 5039–5047.
407. Schaefer, B.C., Strominger, J.L., and Speck, S.H. (1997). Host-cell-determined methylation of specific Epstein-Barr virus promoters regulates the choice between distinct viral latency programs. *Mol. Cell. Biol.* 17, 364–377.
408. Scheenstra, R., Verschuuren, E. a. M., de Haan, A., Slooff, M.J.H., The, T.H., Bijleveld, C.M.A., and Verkade, H.J. (2004). The value of prospective monitoring of Epstein-Barr virus DNA in blood samples of pediatric liver transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 6, 15–22.

409. Schlegelberger, B., Zhang, Y., Weber-Matthiesen, K., and Grote, W. (1994). Detection of aberrant clones in nearly all cases of angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia-type T-cell lymphoma by combined interphase and metaphase cytogenetics. *Blood* 84, 2640–2648.
410. Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G., and Staudt, L.M. (2014). Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4.
411. Schroeder, H.W., and Cavacini, L. (2010). Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S41–52.
412. Schwemmle, M., Clemens, M.J., Hilse, K., Pfeifer, K., Tröster, H., Müller, W.E., and Bachmann, M. (1992). Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 10292–10296.
413. Scimone, M.L., Aifantis, I., Apostolou, I., von Boehmer, H., and von Andrian, U.H. (2006). A multistep adhesion cascade for lymphoid progenitor cell homing to the thymus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7006–7011.
414. Sebzda, E., Mariathasan, S., Ohteki, T., Jones, R., Bachmann, M.F., and Ohashi, P.S. (1999). Selection of the T cell repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 829–874.
415. Seehafer, J.R., Goldberg, N.C., Dicken, C.H., and Su, W.P. (1980). Cutaneous manifestations of angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Arch. Dermatol.* 116, 41–45.
416. Seto, E., Moosmann, A., Grömminger, S., Walz, N., Grundhoff, A., and Hammerschmidt, W. (2010). Micro RNAs of Epstein-Barr virus promote cell cycle progression and prevent apoptosis of primary human B cells. *PLoS Pathog.* 6, e1001063.
417. Shair, K.H.Y., Bendt, K.M., Edwards, R.H., Bedford, E.C., Nielsen, J.N., and Raab-Traub, N. (2007). EBV latent membrane protein 1 activates Akt, NFkappaB, and Stat3 in B cell lymphomas. *PLoS Pathog.* 3, e166.
418. Shaknovich, R., Basso, K., Bhagat, G., Mansukhani, M., Hatzivassiliou, G., Murty, V.V., Buettner, M., Niedobitek, G., Alobeid, B., and Cattoretti, G. (2006). Identification of rare Epstein-Barr virus infected memory B cells and plasma cells in non-monomorphic post-transplant lymphoproliferative disorders and the signature of viral signaling. *Haematologica* 91, 1313–1320.
419. Shannon-Lowe, C., and Rowe, M. (2011). Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog.* 7, e1001338.
420. Shannon-Lowe, C.D., Neuhiel, B., Baldwin, G., Rickinson, A.B., and Delecluse, H.-J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7065–7070.
421. Sharp, T.V., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, C.G., Hilse, K., and Clemens, M.J. (1993). Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res.* 21, 4483–4490.

422. Shen, Y., Zhang, S., Sun, R., Wu, T., and Qian, J. (2015). Understanding the interplay between host immunity and Epstein-Barr virus in NPC patients. *Emerg. Microbes Infect.* *4*, e20.
423. Shibata, D., and Weiss, L.M. (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am. J. Pathol.* *140*, 769–774.
424. Shibata, D., Tokunaga, M., Uemura, Y., Sato, E., Tanaka, S., and Weiss, L.M. (1991). Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am. J. Pathol.* *139*, 469–474.
425. Shibata, Y., Hoshino, Y., Hara, S., Yagasaki, H., Kojima, S., Nishiyama, Y., Morishima, T., and Kimura, H. (2006). Clonality analysis by sequence variation of the latent membrane protein 1 gene in patients with chronic active Epstein-Barr virus infection. *J. Med. Virol.* *78*, 770–779.
426. Shinkai, Y., Rathbun, G., Lam, K.P., Oltz, E.M., Stewart, V., Mendelsohn, M., Charron, J., Datta, M., Young, F., and Stall, A.M. (1992). RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* *68*, 855–867.
427. Shire, K., Kapoor, P., Jiang, K., Hing, M.N.T., Sivachandran, N., Nguyen, T., and Frappier, L. (2006). Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J. Virol.* *80*, 5261–5272.
428. Simon, A., Peoch, M., Casassus, P., Deconinck, E., Colombat, P., Desablens, B., Tournilhac, O., Eghbali, H., Foussard, C., Jaubert, J., et al. (2010). Upfront VIP-reinforced-ABVD (VIP-rABVD) is not superior to CHOP/21 in newly diagnosed peripheral T cell lymphoma. Results of the randomized phase III trial GOELAMS-LTP95. *Br. J. Haematol.* *151*, 159–166.
429. Sinclair, A.J., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J.* *13*, 3321–3328.
430. Singer, A., Adoro, S., and Park, J.-H. (2008). Lineage fate and intense debate: myths, models and mechanisms of CD4- versus CD8-lineage choice. *Nat. Rev. Immunol.* *8*, 788–801.
431. Sivachandran, N., Sarkari, F., and Frappier, L. (2008). Epstein-Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog.* *4*, e1000170.
432. Sivachandran, N., Dawson, C.W., Young, L.S., Liu, F.-F., Middeldorp, J., and Frappier, L. (2012). Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma. *J. Virol.* *86*, 60–68.
433. Sixbey, J.W., and Yao, Q.Y. (1992). Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science* *255*, 1578–1580.
434. Sixbey, J.W., Shirley, P., Chesney, P.J., Buntin, D.M., and Resnick, L. (1989). Detection of a second widespread strain of Epstein-Barr virus. *Lancet Lond. Engl.* *2*, 761–765.

435. Smith, J.L., Hodges, E., Quin, C.T., McCarthy, K.P., and Wright, D.H. (2000a). Frequent T and B cell oligoclonal in histologically and immunophenotypically characterized angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Am. J. Pathol.* 156, 661–669.
436. Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karan, L., Wang, Y., Hayward, S.D., and Farrell, P.J. (2000b). Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74, 3082–3092.
437. Sokol, C.L., Chu, N.-Q., Yu, S., Nish, S.A., Laufer, T.M., and Medzhitov, R. (2009). Basophils function as antigen-presenting cells for an allergen-induced T helper type 2 response. *Nat. Immunol.* 10, 713–720.
438. Soni, V., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2007). LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597, 173–187.
439. Sonnen, R., Schmidt, W.-P., Müller-Hermelink, H.K., and Schmitz, N. (2005). The International Prognostic Index determines the outcome of patients with nodal mature T-cell lymphomas. *Br. J. Haematol.* 129, 366–372.
440. Stansfeld, A.G., Diebold, J., Noel, H., Kapanci, Y., Rilke, F., Kelényi, G., Sundstrom, C., Lennert, K., van Unnik, J.A., and Mioduszevska, O. (1988). Updated Kiel classification for lymphomas. *Lancet Lond. Engl.* 1, 292–293.
441. Strockbine, L.D., Cohen, J.I., Farrah, T., Lyman, S.D., Wagener, F., DuBose, R.F., Armitage, R.J., and Spriggs, M.K. (1998). The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor. *J. Virol.* 72, 4015–4021.
442. Styczynski, J., Einsele, H., Gil, L., and Ljungman, P. (2009). Outcome of treatment of Epstein-Barr virus-related post-transplant lymphoproliferative disorder in hematopoietic stem cell recipients: a comprehensive review of reported cases. *Transpl. Infect. Dis. Off. J. Transplant. Soc.* 11, 383–392.
443. Sugawara, Y., Mizugaki, Y., Uchida, T., Torii, T., Imai, S., Makuuchi, M., and Takada, K. (1999). Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* 256, 196–202.
444. Sugiura, M., Imai, S., Tokunaga, M., Koizumi, S., Uchizawa, M., Okamoto, K., and Osato, T. (1996). Transcriptional analysis of Epstein-Barr virus gene expression in EBV-positive gastric carcinoma: unique viral latency in the tumour cells. *Br. J. Cancer* 74, 625–631.
445. Sun, Zhao, Z., Liu, S., Liu, X., Sun, Z., and Luo, B. (2015). Sequence Variation Analysis of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 Gene in the Virus Associated Lymphomas of Northern China. *PloS One* 10, e0140529.
446. Suzuki, R. (2014). Pathogenesis and treatment of extranodal natural killer/T-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* 51, 42–51.
447. Swerdlow, S.H., Campo, E., Pileri, S.A., Harris, N.L., Stein, H., Siebert, R., Advani, R., Ghielmini, M., Salles, G.A., Zelenetz, A.D., et al. (2016). The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* 127, 2375–2390.

I

448. Tabiasco, J., Vercellone, A., Meggetto, F., Hudrisier, D., Brousset, P., and Fournié, J.-J. (2003). Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *170*, 5993–5998.
449. Tagliavini, E., Rossi, G., Valli, R., Zanelli, M., Cadioli, A., Mengoli, M.C., Bisagni, A., Cavazza, A., and Gardini, G. (2013). Lymphomatoid granulomatosis: a practical review for pathologists dealing with this rare pulmonary lymphoproliferative process. *Pathologica* *105*, 111–116.
450. Takada, K., and Ono, Y. (1989). Synchronous and sequential activation of latently infected Epstein-Barr virus genomes. *J. Virol.* *63*, 445–449.
451. Takakuwa, T., Luo, W.-J., Ham, M.F., Wada, N., and Aozasa, K. (2005). Identification of Epstein-Barr virus integrated sites in lymphoblastoid cell line (IB4). *Virus Res.* *108*, 133–138.
452. Takeshita, H., Yoshizaki, T., Miller, W.E., Sato, H., Furukawa, M., Pagano, J.S., and Raab-Traub, N. (1999). Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 C-terminal activation regions 1 and 2. *J. Virol.* *73*, 5548–5555.
453. Takeuchi, H., Kobayashi, R., Hasegawa, M., and Hirai, K. (1997). Detection of latent Epstein-Barr virus (EBV) DNA in paraffin sections of nasopharyngeal carcinomas expressing no EBV-encoded small RNAs using in situ PCR. *Arch. Virol.* *142*, 1743–1756.
454. Tan, B.T., Warnke, R.A., and Arber, D.A. (2006). The frequency of B- and T-cell gene rearrangements and epstein-barr virus in T-cell lymphomas: a comparison between angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified with and without associated B-cell proliferations. *J. Mol. Diagn. JMD* *8*, 466–475; quiz 527.
455. Tangye, S.G., Palendira, U., and Edwards, E.S.J. (2017). Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J. Exp. Med.* *214*, 269–283.
456. Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., and Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* *50*, 203–213.
457. Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A., and Ambinder, R.F. (1998). Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* *91*, 1373–1381.
458. Tchernonog, E., Faurie, P., Coppo, P., Monjanel, H., Bonnet, A., Algarte Génin, M., Mercier, M., Dupuis, J., Bijou, F., Herbaux, C., et al. (2017). Clinical characteristics and prognostic factors of plasmablastic lymphoma patients: analysis of 135 patients from the LYSA group. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* *28*, 843–848.
459. Tempera, I., De Leo, A., Kossenkov, A.V., Cesaroni, M., Song, H., Dawany, N., Showe, L., Lu, F., Wikramasinghe, P., and Lieberman, P.M. (2015). Identification of MEF2B, EBF1, and IL6R as Direct Gene Targets of Epstein-Barr Virus (EBV) Nuclear Antigen 1 Critical for EBV-Infected B-Lymphocyte Survival. *J. Virol.* *90*, 345–355.

460. Thomas, R., Macsween, K.F., McAulay, K., Clutterbuck, D., Anderson, R., Reid, S., Higgins, C.D., Swerdlow, A.J., Harrison, N., Williams, H., et al. (2006). Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J. Med. Virol.* 78, 1204–1209.
461. Thorley-Lawson, D.A. (2015). EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 151–209.
462. Thorley-Lawson, D.A., Duca, K.A., and Shapiro, M. (2008). Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. *Trends Immunol.* 29, 195–201.
463. Tilly, H., Lepage, E., Coiffier, B., Blanc, M., Herbrecht, R., Bosly, A., Attal, M., Fillet, G., Guettier, C., Molina, T.J., et al. (2003). Intensive conventional chemotherapy (ACVBP regimen) compared with standard CHOP for poor-prognosis aggressive non-Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 4284–4289.
464. Tobinai, K., Minato, K., Ohtsu, T., Mukai, K., Kagami, Y., Miwa, M., Watanabe, S., and Shimoyama, M. (1988). Clinicopathologic, immunophenotypic, and immunogenotypic analyses of immunoblastic lymphadenopathy-like T-cell lymphoma. *Blood* 72, 1000–1006.
465. Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 67, 2014–2025.
466. Tripodo, C., Gri, G., Piccaluga, P.P., Frossi, B., Guarnotta, C., Piconese, S., Franco, G., Vetri, V., Pucillo, C.E., Florena, A.M., et al. (2010). Mast cells and Th17 cells contribute to the lymphoma-associated pro-inflammatory microenvironment of angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am. J. Pathol.* 177, 792–802.
467. Tsao, S.-W., Tsang, C.M., To, K.-F., and Lo, K.-W. (2015). The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J. Pathol.* 235, 323–333.
468. Tsoukas, C.D., and Lambris, J.D. (1988). Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18, 1299–1302.
469. Tsurumi, T., Fujita, M., and Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev. Med. Virol.* 15, 3–15.
470. Tugizov, S.M., Berline, J.W., and Palefsky, J.M. (2003). Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat. Med.* 9, 307–314.
471. Tzellos S, Farrell P. 2012. Epstein-Barr virus sequence variation— biology and disease. *Pathogens* 1:156–174/pathogens1020156 .

U

472. Uchida, J., Yasui, T., Takaoka-Shichijo, Y., Muraoka, M., Kulwichit, W., Raab-Traub, N., and Kikutani, H. (1999). Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300–303.

473. Usui, T., Nishikomori, R., Kitani, A., and Strober, W. (2003). GATA-3 suppresses Th1 development by downregulation of Stat4 and not through effects on IL-12Rbeta2 chain or T-bet. *Immunity* 18, 415–428.

V

474. Valentine, R., Dawson, C.W., Hu, C., Shah, K.M., Owen, T.J., Date, K.L., Maia, S.P., Shao, J., Arrand, J.R., Young, L.S., et al. (2010). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF-kappaB pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation. *Mol. Cancer* 9, 1.
475. Valera, A., Balagué, O., Colomo, L., Martínez, A., Delabie, J., Taddesse-Heath, L., Jaffe, E.S., and Campo, E. (2010). IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 1686–1694.
476. Vallois, D., Dobay, M.P.D., Morin, R.D., Lemonnier, F., Missiaglia, E., Juilland, M., Iwaszkiewicz, J., Fataccioli, V., Bisig, B., Roberti, A., et al. (2016). Activating mutations in genes related to TCR signaling in angioimmunoblastic and other follicular helper T-cell-derived lymphomas. *Blood* 128, 1490–1502.
477. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 24, 179–189.
478. Vereide, D.T., Seto, E., Chiu, Y.-F., Hayes, M., Tagawa, T., Grundhoff, A., Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (2014). Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* 33, 1258–1264.
479. Verhoeven, R.J.A., Tong, S., Zhang, G., Zong, J., Chen, Y., Jin, D.-Y., Chen, M.-R., Pan, J., and Chen, H. (2016). NF-κB Signaling Regulates Expression of Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Virol.* 90, 6475–6488.
480. Vockerodt, M., Morgan, S.L., Kuo, M., Wei, W., Chukwuma, M.B., Arrand, J.R., Kube, D., Gordon, J., Young, L.S., Woodman, C.B., et al. (2008). The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J. Pathol.* 216, 83–92.
481. Vockerodt, M., Yap, L.-F., Shannon-Lowe, C., Curley, H., Wei, W., Vrzalikova, K., and Murray, P.G. (2015). The Epstein-Barr virus and the pathogenesis of lymphoma. *J. Pathol.* 235, 312–322.
482. Vose, J.M. (2008). Peripheral T-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 22, 997–1005, x.
483. Vose, J., Armitage, J., Weisenburger, D., and International T-Cell Lymphoma Project (2008). International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: pathology findings and clinical outcomes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 26, 4124–4130.

W

484. Walling, D.M., Flaitz, C.M., Nichols, C.M., Hudnall, S.D., and Adler-Storthz, K. (2001). Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J. Infect. Dis.* 184, 1499–1507.
485. Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* 43, 831–840.
486. Wang, F., Tsang, S.F., Kurilla, M.G., Cohen, J.I., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J. Virol.* 64, 3407–3416.
487. Wang, F., Chen, W., Liu, P., Zhou, J., Liu, B., Ye, W., Wang, W., and Shen, X. (2017). Lentivirus-mediated RNAi knockdown of LMP2A inhibits the growth of the Epstein-Barr-associated gastric carcinoma cell line GT38 in vitro. *Exp. Ther. Med.* 13, 187–193.
488. Wang, K., Yuen, S.T., Xu, J., Lee, S.P., Yan, H.H.N., Shi, S.T., Siu, H.C., Deng, S., Chu, K.M., Law, S., et al. (2014). Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat. Genet.* 46, 573–582.
489. Watry, D., Hedrick, J.A., Siervo, S., Rhodes, G., Lamberti, J.J., Lambris, J.D., and Tsoukas, C.D. (1991). Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 173, 971–980.
490. Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3+ T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723–1742, S1.
491. Weiss, L.M., Strickler, J.G., Dorfman, R.F., Horning, S.J., Warnke, R.A., and Sklar, J. (1986). Clonal T-cell populations in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Am. J. Pathol.* 122, 392–397.
492. Weiss, L.M., Strickler, J.G., Warnke, R.A., Purtilo, D.T., and Sklar, J. (1987). Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* 129, 86–91.
493. Weiss, L.M., Jaffe, E.S., Liu, X.F., Chen, Y.Y., Shibata, D., and Medeiros, L.J. (1992). Detection and localization of Epstein-Barr viral genomes in angioimmunoblastic lymphadenopathy and angioimmunoblastic lymphadenopathy-like lymphoma. *Blood* 79, 1789–1795.
494. Widney, D., Boscardin, W.J., Kasravi, A., and Martínez-Maza, O. (2003). Expression and function of CD28 on Epstein-Barr virus-positive B cell lines and AIDS-associated non-Hodgkin's lymphoma cell lines. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 24, 82–93.
495. Willenbrock, K., Bräuninger, A., and Hansmann, M.-L. (2007). Frequent occurrence of B-cell lymphomas in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and proliferation of Epstein-Barr virus-infected cells in early cases. *Br. J. Haematol.* 138, 733–739.
496. Williams, H., Macsween, K., McAulay, K., Higgins, C., Harrison, N., Swerdlow, A., Britton, K., and Crawford, D. (2004). Analysis of immune activation and clinical events in acute infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis.* 190, 63–71.

497. Winberg, G., Matskova, L., Chen, F., Plant, P., Rotin, D., Gish, G., Ingham, R., Ernberg, I., and Pawson, T. (2000). Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8526–8535.
498. Witt, C.M., Raychaudhuri, S., Schaefer, B., Chakraborty, A.K., and Robey, E.A. (2005). Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time. *PLoS Biol.* 3, e160.
499. Wood, V.H.J., O’Neil, J.D., Wei, W., Stewart, S.E., Dawson, C.W., and Young, L.S. (2007). Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene* 26, 4135–4147.
500. Wu, H., Kapoor, P., and Frappier, L. (2002). Separation of the DNA replication, segregation, and transcriptional activation functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1. *J. Virol.* 76, 2480–2490.

X

501. Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J., and Tugizov, S.M. (2008). The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology* 370, 430–442.
502. Xiao, J., Palefsky, J.M., Herrera, R., Berline, J., and Tugizov, S.M. (2009). EBV BMRF-2 facilitates cell-to-cell spread of virus within polarized oral epithelial cells. *Virology* 388, 335–343.
503. Xie, P., Kraus, Z.J., Stunz, L.L., and Bishop, G.A. (2008). Roles of TRAF molecules in B lymphocyte function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 19, 199–207.
504. Xie, Y., Wu, Y., Zhou, X., Yao, M., Ning, S., and Wei, Z. (2016). Association of polymorphisms hOGGI rs1052133 and hMUTYH rs3219472 with risk of nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *OncoTargets Ther.* 9, 755–760.
505. Xu, B., and Liu, P. (2014). No survival improvement for patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma over the past two decades: a population-based study of 1207 cases. *PLoS One* 9, e92585.

Y

506. Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., and Yamamoto, N. (2000). Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett.* 484, 153–158.
507. Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K., and Takada, K. (2004). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer Res.* 64, 5332–5337.
508. Yasui, T., Luftig, M., Soni, V., and Kieff, E. (2004). Latent infection membrane protein transmembrane FWLY is critical for intermolecular interaction, raft localization, and signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 278–283.

509. Yates, J., Warren, N., Reisman, D., and Sugden, B. (1984). A cis-acting element from the Epstein-Barr viral genome that permits stable replication of recombinant plasmids in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 3806–3810.
510. Yokoyama, A., Tanaka, M., Matsuda, G., Kato, K., Kanamori, M., Kawasaki, H., Hirano, H., Kitabayashi, I., Ohki, M., Hirai, K., et al. (2001). Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J. Virol.* *75*, 5119–5128.
511. Yoo, H.Y., Kim, P., Kim, W.S., Lee, S.H., Kim, S., Kang, S.Y., Jang, H.Y., Lee, J.-E., Kim, J., Kim, S.J., et al. (2016). Frequent CTLA4-CD28 gene fusion in diverse types of T-cell lymphoma. *Haematologica* *101*, 757–763.
512. Young, L.S., and Murray, P.G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* *22*, 5108–5121.
513. Young, L.S., and Rickinson, A.B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* *4*, 757–768.
514. Young, L., Alfieri, C., Hennessy, K., Evans, H., O'Hara, C., Anderson, K.C., Ritz, J., Shapiro, R.S., Rickinson, A., and Kieff, E. (1989). Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* *321*, 1080–1085.
515. Young, L.S., Lau, R., Rowe, M., Niedobitek, G., Packham, G., Shanahan, F., Rowe, D.T., Greenspan, D., Greenspan, J.S., and Rickinson, A.B. (1991). Differentiation-associated expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator protein in oral hairy leukoplakia. *J. Virol.* *65*, 2868–2874.

Z

516. Zettl, A., Lee, S.-S., Rüdiger, T., Starostik, P., Marino, M., Kirchner, T., Ott, M., Müller-Hermelink, H.K., and Ott, G. (2002). Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders in angioimmunoblastic T-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma, unspecified. *Am. J. Clin. Pathol.* *117*, 368–379.
517. Zhang, Q., Brooks, L., Busson, P., Wang, F., Charron, D., Kieff, E., Rickinson, A.B., and Tursz, T. (1994). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *Eur. J. Immunol.* *24*, 1467–1470.
518. Zhang, T., Fu, Q., Gao, D., Ge, L., Sun, L., and Zhai, Q. (2014). EBV associated lymphomas in 2008 WHO classification. *Pathol. Res. Pract.* *210*, 69–73.
519. Zhou, L., Chong, M.M.W., and Littman, D.R. (2009). Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. *Immunity* *30*, 646–655.
520. Zhou, Y., Attygalle, A.D., Chuang, S.-S., Diss, T., Ye, H., Liu, H., Hamoudi, R.A., Munson, P., Bacon, C.M., Dogan, A., et al. (2007). Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: histological progression associates with EBV and HHV6B viral load. *Br. J. Haematol.* *138*, 44–53.

521. Zhu, J., Jankovic, D., Grinberg, A., Guo, L., and Paul, W.E. (2006). Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18214–18219.
522. Zimmer, U., Adldinger, H.K., Lenoir, G.M., Vuillaume, M., Knebel-Doeberitz, M.V., Laux, G., Desgranges, C., Wittmann, P., Freese, U.K., and Schneider, U. (1986). Geographical prevalence of two types of Epstein-Barr virus. *Virology* *154*, 56–66.
523. Zimmer-Strobl, U., and Strobl, L.J. (2001). EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin. Cancer Biol.* *11*, 423–434.
524. Zimmer-Strobl, U., Suentzenich, K.O., Laux, G., Eick, D., Cordier, M., Calender, A., Billaud, M., Lenoir, G.M., and Bornkamm, G.W. (1991). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 activates transcription of the terminal protein gene. *J. Virol.* *65*, 415–423.
525. Zimmer-Strobl, U., Strobl, L.J., Meitinger, C., Hinrichs, R., Sakai, T., Furukawa, T., Honjo, T., and Bornkamm, G.W. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *EMBO J.* *13*, 4973–4982.
526. Zotos, D., Coquet, J.M., Zhang, Y., Light, A., D’Costa, K., Kallies, A., Corcoran, L.M., Godfrey, D.I., Toellner, K.-M., Smyth, M.J., et al. (2010). IL-21 regulates germinal center B cell differentiation and proliferation through a B cell-intrinsic mechanism. *J. Exp. Med.* *207*, 365–378.

Annexe 1. Tableau de patients

Diagnostic	Sexe	Age	Organes infiltrés	Statut EBV	Date de diagnostic	Date de dernières nouvelles	Date de décès
AIL1	F	73	Ganglions	EBV+	22-12-00		Décédé
AIL2	M	62	Ganglions	EBV+	10-06-04		2014
AIL3	M	80	Ganglions	EBV+	24-07-08		2010
AIL4	F	55	Ganglions	EBV+	05-03-14		2015
AIL5	F	66	Ganglions	EBV+	09-03-05		2009
AIL6	F	84	Ganglions	EBV+	14-06-10		2011
AIL7	F	59	Ganglions	EBV+	15-05-09		2013
AIL8	F	52	Ganglions	EBV+	22-12-05		2017
AIL9	F	76	Ganglions	EBV+	19-06-08		2009
AIL10	F	53	Ganglions	EBV+	06-06-06	Août 2017	
AIL11	M	59	Ganglions	EBV+	06-06-06		2015
AIL12	F	56	Ganglions	EBV+	11-07-06		2017
AIL13	F	78	Ganglions	EBV+	08-09-11	Août 2017	
AIL14	M	62	Ganglions	EBV+	17-08-00		2003
AIL15	M	67	Ganglions	EBV+	09-12-13	Août 2017	
AIL16	M	50	Ganglions	EBV+	23-07-13		2014
AIL17	F	84	Ganglions	EBV+	16-11-11	Août 2017	
AIL18	F	67	Ganglions	EBV+	13-05-11	Août 2017	
AIL19	H	28	Ganglions	EBV+	17-05-10	Août 2017	
AIL20	H	69	Ganglions	EBV+	23-08-07	Août 2017	
ALCL1	F	73	Ganglions	EBV+	10-01-14	Août 2017	
CTCL1	F	73	Ganglions	EBV+	18-08-08		2009
PTCLnot specified	F	64	Ganglions	EBV+	14-09-06	Août 2017	
PTCLnot specified	H	46	Ganglions	EBV+	07-03-08		2008
NK/TL1	M	63	Ganglions	EBV+	28-10-08	Août 2017	
NK/TL2	M	64	Ganglions	EBV+	23-05-13	Août 2017	
PTTL1	M	63	Ganglions	EBV+	29-04-10		2011
PTBL1	M	28	Ganglions	EBV+	09-09-15	Août 2027	
PTBL2	F	63	Ganglions	EBV+	22-10-09		2009
PTBL3	F	65	Ganglions	EBV+	25-11-11	Août 2017	
PTBL4	F	52	Ganglions	EBV+	20-02-07	Août 2017	
DLBCL1	F	74	Ganglions	EBV+	25-07-02		2005
DLBCL2	M	77	Ganglions	EBV+	27-05-11		2011
DLBCL3	F	59	Ganglions	EBV+	19-11-07		2012
DLBCL4	F	31	Ganglions	EBV+	29-12-06		2016
DLBCL5	M	39	Ganglions	EBV+	09-09-15	Août 2017	

DLBCL6	F	38	Ganglions	EBV+	30-04-14	Août 2017	
LPL1	F	18	Ganglions	EBV+	22-12-14	Août 2017	
ARL1	F	89	Ganglions	EBV+	09-10-09		2000
ARL2	F	76	Ganglions	EBV+	15-03-13	Août 2017	
ARL2'	F	76	Ganglions	EBV+	15-03-13	Août 2017	
Control1	F	72	Ganglions	EBV+			
PI1	M	13	Sérum	EBV+			
PI2	M	6	Sérum	EBV+			
PI3	M	13	Sérum	EBV+			
PI4	F	19	Sérum	EBV+			
PI5	M	8	Sérum	EBV+			
PI6	M	20	Sérum	EBV+			
PI7	M	2	Sérum	EBV+			
PI8	F	28	Sérum	EBV+			
PI9	F	17	Sérum	EBV+			
PI10	F	6	Sérum	EBV+			
PI11	M	24	Sérum	EBV+			
PI12	F	30	Sérum	EBV+			
PI13	M	14	Sérum	EBV+			
PI14	F	12	Sérum	EBV+			
PI15	M	26	Sérum	EBV+			

AIL =Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
 DLBCL = Diffuse large B-cell lymphoma
 CTCL = Cutaneous T cell lymphoma
 ALCL = Anaplastic large cell lymphoma (T)
 ARL = Age related lymphoma
 LPL = Lymphoplasmocytic lymphoma
 NK/TL = NK/T cell lymphoma
 PTTL = Post-transplant T lymphoma
 PTBL = Post-transplant B lymphoma
 PI = Primo-infection

Annexe 2. Mutations au niveau des protéines de latence

EBNA-1

Mutations	Domaine	Epitopes cible de CD4+	Epitopes cible de CD8+	Autre fonction
E16Q	N-terminal	-	-	Domaine essentiel pour la transcription des gènes transformants
G18E	N-terminal	-	-	
E24D	N-terminal	-	-	
G27S	N-terminal	-	-	
V70A	N-terminal	-	-	
Q74P	N-terminal	RRPQKRPSIGCKGT	RPQKRPSI	
T85A	N-terminal	RRPQKRPSIGCKGT		Mutations dans des domaines fonctionnels tels que : domaine de la dimérisation et la liaison avec l'ADN
V429M	C-terminal	VPPGAIEQGPADDPGEGPST	-	
A439T	C-terminal	VPPGAIEQGPADDPGEGPST IEQGPTDDPGEGPSTGPRGQGDGG	-	
P476Q	C-terminal	SNPKFENIAEGLRVLLARSH NPKFENIAEGLRALL	-	
A487T A487V	C-terminal	SNPKFENIAEGLRVLLARSH NPKFENIAEGLRALL ENIAEGLRVLLARSHVERTT (DQ7) IAEGLRALLARSHVERTTDE (DQ2/3) LRALLARSHVERTTD	-	
S492C	C-terminal	SNPKFENIAEGLRVLLARSH ENIAEGLRVLLARSHVERTT(DQ7) IAEGLRALLARSHVERTTDE (DQ2/3) LRALLARSHVERTTD	-	
D499E	C-terminal	LRALLARSHVERTTD EEGNWVAGVFVYGGSKTSLYNLRRG	-	
T524I	C-terminal	VYGGSKTSLYNLRRGTALAI DR11 TSLYNLRRGTALAI DR1 YNLRRGTALAI PQ DP3 NLRRGTALAI PQCRLL EEGNWVAGVFVYGGSKTS	-	
M563I	C-terminal	APGPGPQPLRESIVCYFM PQPGPLRESIVCYFMVFLQT PGPLRESIVCYFMVFLQTHI DR1 LRESIVCYFMVFLQTHIFAE LRESIVCYFMVFLQTHIFAEVLKDA YFMVFLQTHIFAE DR11,12,13 MVFLQTHIFAEVLKD	-	
V574G	C-terminal	MVFLQTHIFAEVLKD VFLQTHIFAEVLKDAIKDL DP5 VLKDAIKDLVMTKPAPTCNI	VLKDAIKDL A2.03	
T585P	C-terminal	VLKDAIKDLVMTKPAPTCNI	-	
R594K	C-terminal	PTCNIKVTVCSFDDGVLDPPWFPPM	-	

		RVTVCSFDDGVDLPPWFPPM		
V595A	C-terminal	RVTVCSFDDGVDLPPWFPPM	-	

EBNA-2

Mutations	Epitopes cible de CD4+	Domaines (autre fonction)
R163G R163M	-	Domaine de dimérisation
Q185R	-	Domaine de dimérisation
M195I	-	Domaine de dimérisation
M196I	-	Domaine de dimérisation
T204S	-	Domaine de dimérisation
L206V	LPPATLVPPRPTRPTTLPP	-
L211dup	LPPATLVPPRPTRPTTLPP	-
L314S	PAQPPPGVINDQQLHHLPSG DR17	-
H316N	PAQPPPGVINDQQLHHLPSG DR17	-
Y474F	-	Domaine de transactivation
E476G	-	Domaine de transactivation
S485P	-	Signal de localisation nucléaire
S485fs	-	Signal de localisation nucléaire

EBNA-3A

Mutations	Epitope cible de CD4+	Epitope cible de CD8+
I333L	-	FLRGRAYGL B8
G340F	-	-
P459T	-	YPLHEQHGM B35.01
E462K	-	YPLHEQHGM B35.01
H464R	-	YPLHEQHGM B35.01
M466T	-	YPLHEQHGM B35.01
E492S	-	VFSDGRVAC A29
D494E	-	VFSDGRVAC A29
P620T	-	VQPPQLTLQV B46
A661E	QVADVVRAPGVPAMQPQYF	-
D668A	QVADVVRAPGVPAMQPQYF	-

EBNA-3B

Mutations	Epitope cible de CD8+
I225L	TYSAGIVQI A24.02
A399S	AVFDRKSDAK A11
V400L	AVFDRKSDAK A11
K424N	IVTDFSVIK A11
A488T	AVLLHEESM B35.01

I659L	VEITPYKPTW B44
-------	----------------

EBNA-3C

Mutations	Epitopes cible de CD4+	Epitope cible de CD8+
T104A	PHDITYPYTARNIRDAACRAV DR16	-
T104P	PHDITYPYTARNIRDAACRAV DR16	-
T107A	PHDITYPYTARNIRDAACRAV DR16	-
T107I	PHDITYPYTARNIRDAACRAV DR16	-
I141V	ILCFVMAARQRLQDI DR13	-
A215G	-	QNGALAINTF B62
T221S	-	QNGALAINTF B62
R255K	-	LRGKWQRRYR B27.05
R259K	-	RRIYDLIEL B27.02/.04/.05
I348L	-	FRKAQIQGL B27.05
D394Y	SDDELPYIDPNMEPV DQ5	-
V554A	QKRAAPPTVSPSDTG	-
R597P	PPAAGPPAAGPRILA	-
I598V	PPAAGPPAAGPRILA	-
I598T	PPAAGPPAAGPRILA	-
L599V	PPAAGPPAAGPRILA	-
L599P	PPAAGPPAAGPRILA	-
A600T	PPAAGPPAAGPRILA	-
A600G	PPAAGPPAAGPRILA	-
P753Q	PAPQAPYQGYQEPPAPQAPY DR1/DR4	-
A921S	PSMPFASDYSQGAFT	-
A978S	AQEILSDNSEISVFPK	-

LMP-1

Mutations	Epitope cible de CD4+	Epitope cible de CD8+
H352R	TDGGGGHSHDSGHGG	-
S347R	TDGGGGHSHDSGHGG	-
H346D	TDGGGGHSHDSGHGG	-
S229T	SSHESDSNSNEGRHLLVSG DQB1*0601	-
G212S	QATDDSSHESDSNSNEGRHH DQ2	-
S192T	LIWMYYHGPRHTDEHHHDDS DR16	-
Q189P	LIWMYYHGPRHTDEHHHDDS DR16	-

F144I	LWRLGATIWQLLAFF	-
M129I	-	YLLEMLWRL A2
L126F	-	YLLEMLWRL A2
A82G	-	FRRDLLCPLGA B40
D46N	-	FWLYIVMSD

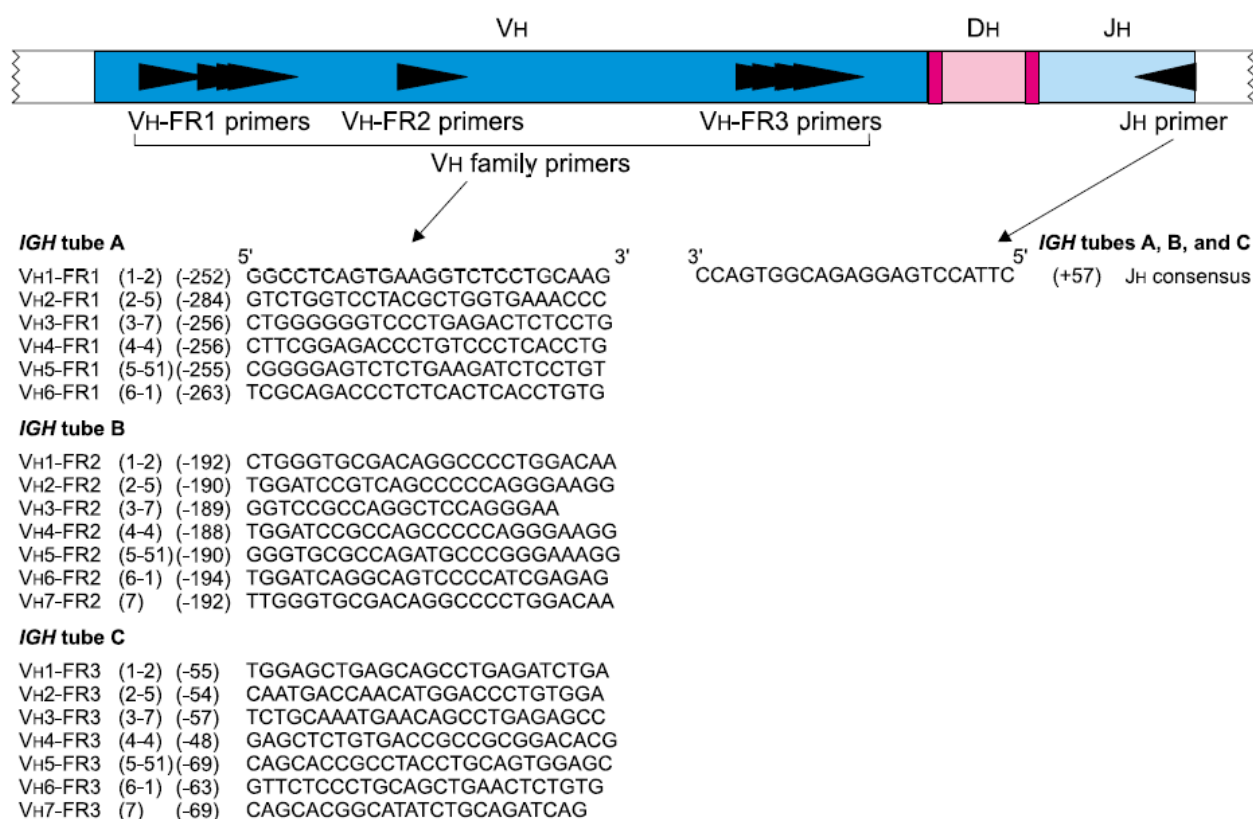
LMP-2

Mutations	Epitope cible de CD4+	Epitope cible de CD4+	Domaine (autres fonctions)
S384G	-	CD8	-
S444T	-	VMSNTLLSAW A25	-
Y23D	-		-
P63L	-	EDPYWGNGDRHSDYQ	-
Y64D	-	EDPYWGNGDRHSDYQ	Domaine de liaison à l'ubiquitine ligase
T79N	DYQPLGTQDQSLYL DR4 or DR16	-	-
Q82P	DYQPLGTQDQSLYL DR4 or DR16	-	-

Annexe 3. Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements de l'Ig

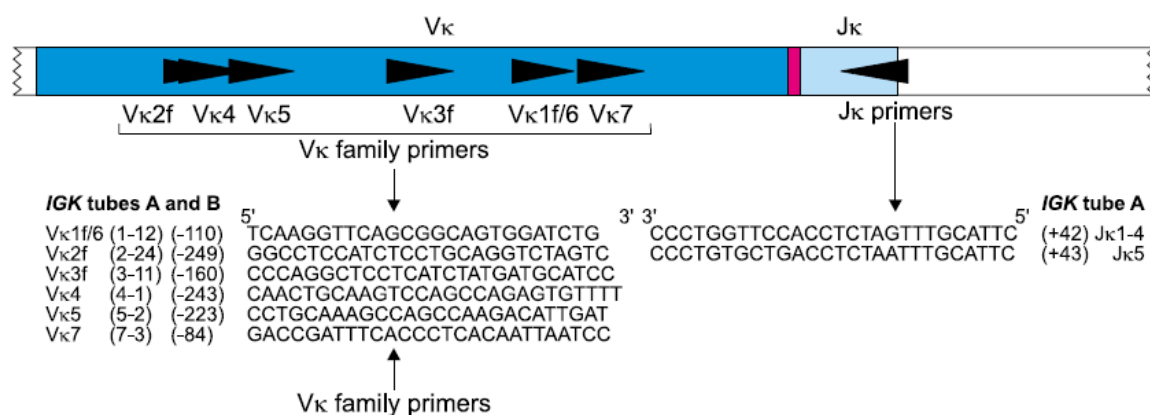
A) Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements VH-JH de la chaîne lourde

Modifié d'après (van Dongen et al., 2003).



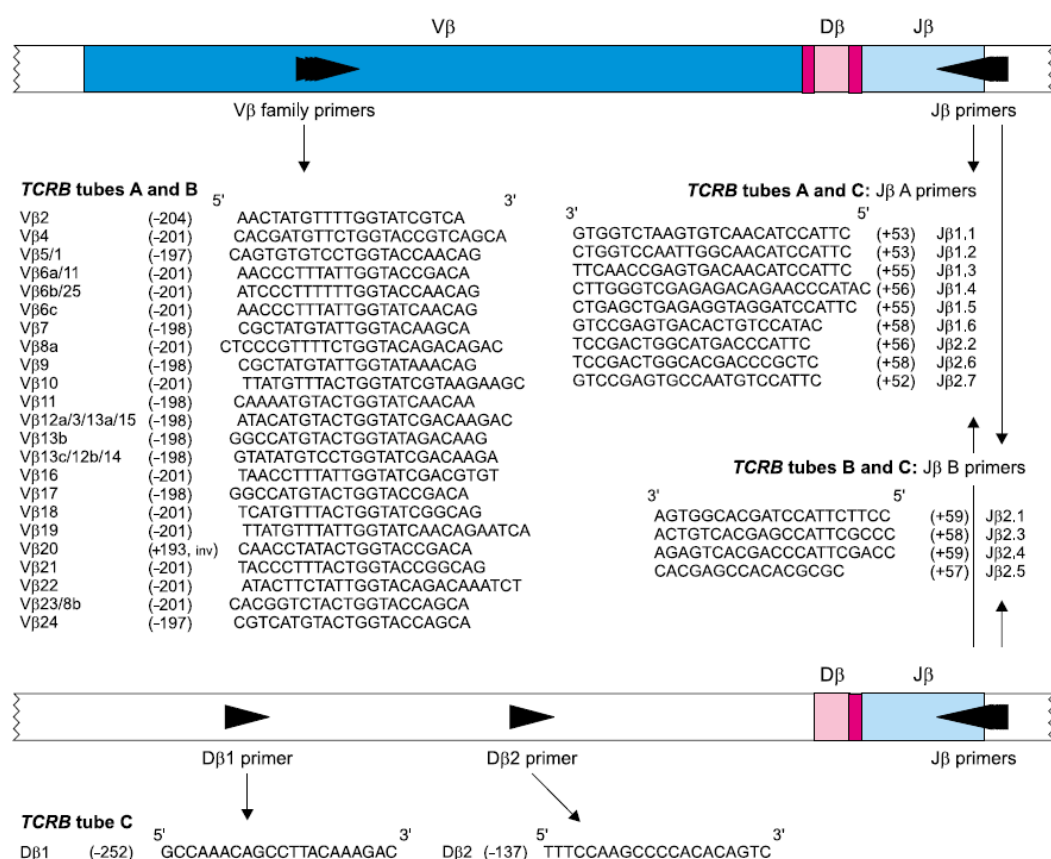
B) Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements V k-J k de la chaîne légère.

Modifié d'après (van Dongen et al., 2003).

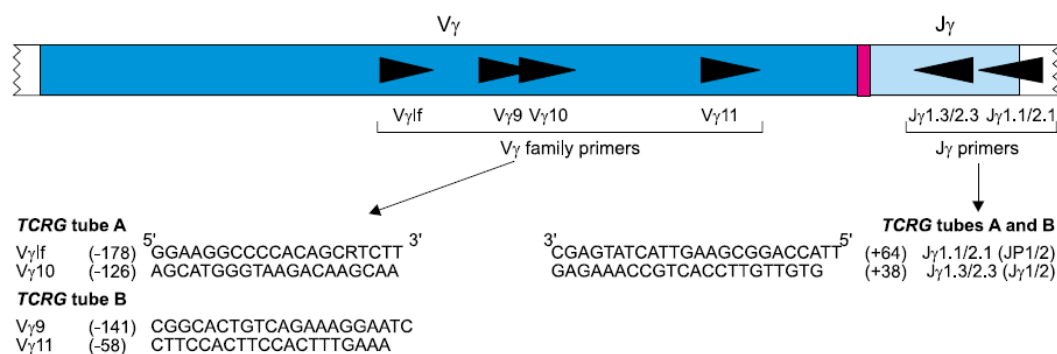


Annexe 4. Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements de TCR

A) Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements V β -J β et D β -J β Modifié d'après (van Dongen et al., 2003).



B) Amorces utilisées pour l'amplification des réarrangements V γ -J γ . Modifié d'après (van Dongen et al., 2003).



Séquençage du génome complet du virus d'Epstein-Barr dans des prélèvements issus de lymphomes T angioimmunoblastiques comparativement aux autres types de lymphomes par NGS

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus humain qui infecte plus de 90% de la population mondiale. Il est décrit comme associé à plusieurs pathologies cancéreuses humaines comme les carcinomes nasopharyngés et gastriques et divers lymphomes, comme le lymphome de Burkitt, les lymphomes NK/T et certains lymphomes de Hodgkin.

Le lymphome T angio-immunoblastique (LTAI), un cancer des cellules T folliculaires *helper* T_{FH}, contient souvent des cellules B porteuses de l'EBV. Mais jusqu'à présent le rôle de l'EBV dans la pathogenèse de cette maladie reste inconnu.

Dans ce contexte, notre travail avait pour objectif de déterminer si l'EBV associé au LTAI présentait une particularité laissant envisager son rôle dans cette pathologie. Pour ce faire, nous avons étudié la séquence complète de l'EBV au sein d'échantillons de LTAI et comparé les résultats à ceux obtenus pour d'autres lymphomes (B, NK/T) ainsi qu'aux séquences publiées.

Le séquençage a tout d'abord été réalisé sur 7 lignées cellulaires positives pour l'EBV, afin de valider la technique, et a ensuite été appliqué aux échantillons d'adénopathies de 40 patients atteints de syndrome lymphoprolifératif, parmi lesquels 20 souffraient de LTAI. L'enrichissement en génome viral a été réalisé par capture à l'aide de sondes spécifiques du génome de l'EBV. Ensuite les bibliothèques ont été synthétisées et séquencées sur les plateformes *Illumina MiSeq* et *NextSeq*. Dans un deuxième temps, nous avons réalisé l'assemblage *de novo* des reads et déterminé la séquence complète du virus majoritaire dans chaque échantillon. Les données obtenues ont été analysées bioinformatiquement.

D'une manière intéressante, le virus a été trouvé clonal ou quasi-clonal dans les LTAI alors que les lymphocytes B étaient dans la plupart des cas polyclonaux. En outre, le profil de mutations trouvé présentait des similitudes avec ce qui était trouvé pour les autres lymphomes associés à l'EBV, notamment au niveau des épitopes cibles des cellules de l'immunité suggérant un processus de sélection de la souche virale identique à celui d'une tumeur clonale associée à l'EBV. Ceci pourrait jouer un rôle important dans l'échappement au système immunitaire du virus dans ce contexte multicellulaire complexe. La présence de cellules B polyclonales avec un EBV clonal dans un compartiment T tumoral clonal pourrait relever d'une double sélection tumorale, endogène T et exogène EBV clonal, et pourrait suggérer l'existence de cross-talk entre les cellules B-T.

Mots-clés : virus d'Epstein-Barr, lymphomes, lymphome angio-immunoblastiques, séquençage, mutation, clonal, épitopes, échappement au système immunitaire

More than 90% of the world's population is infected by Epstein-Barr virus (EBV), a human herpesvirus. EBV is thought to be implicated in the pathogenesis of several human malignancies including epithelial tumors such as nasopharyngeal and gastric carcinomas as well as lymphoproliferative diseases such as Burkitt's lymphoma, NK/T lymphomas and some Hodgkin lymphomas.

In angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL), a peripheral neoplasm of follicular helper T (T_{FH}) cells, a recurrent finding is the presence of EBV-positive B lymphocytes at the beginning of the disease. However, whether this EBV infection of B cells plays a role in AITL pathogenesis remains unclear.

In this context, our work aimed to determine if the EBV associated with the AITL presented an oncogenic profile allowing us to consider its role in this pathology. To do this, we sequenced the whole EBV genomes in AITL samples and compared the results to those obtained for other lymphomas (B, NK / T) as well as to previously published sequences.

Sequencing was first performed on 7 EBV-positive cell lines to validate the technique, and then was applied to lymphadenopathy specimens from 40 patients with lymphoproliferative disease, of whom 20 had AITL. Enrichment of the viral genome was performed by capture using specific EBV genome probes. The libraries were synthesized and sequenced on Illumina MiSeq and NextSeq platforms. In a second step, we performed *de novo* assembly and determined the sequence of the virus in each sample. The data obtained were analyzed bioinformatically.

Interestingly, the virus was found to be clonal or quasi-clonal in AITL, while B cells were in some cases polyclonal. In addition, the mutational pattern was similar to other EBV-associated lymphomas, especially at the level of the target epitopes of immune cells suggesting a process of selection of the viral strain identical to that of a clone tumor associated with EBV. This could play an important role in the virus escape from the immune system in this context. The presence of polyclonal B cells with clonal EBV in a clonal tumor T cell compartment could be a dual tumor selection; or that is endogenous T and exogenous clonal EBV, and could therefore suggest the existence of a cross-talk between B-T cells.

Keywords: Epstein-Barr virus, lymphomas, angio-immunoblastic lymphoma, sequencing, mutation, clonal, epitope, immune escape