

Université de Limoges

ED 652 – OMEGALIM Biologie, Chimie, Santé (BCS)

CNRS UMR 7276 INSERM 1262 – Laboratoire CRIBL : Contrôle de la Réponse Immune B et des Lymphoproliférations - Equipe 2MB2C : Axe Mécanismes de lymphomagénèse

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Spécialité : Immunologie, oncologie, inflammation et infectiologie

Présentée et soutenue par
Nader BAYDA

Le 20 décembre 2022

Analyse du transcriptome du virus d'Epstein-Barr (EBV) par séquençage de nouvelle génération (NGS) dans les cellules et les exosomes de lymphomes humains et particulièrement de lymphome T angio-immunoblastique (LAI)

Thèse dirigée par : Pr. Sylvie ROGEZ et Dr. Mohamad Adnan HALABI

JURY :

Président du jury

M. Jean FEUILLARD, Professeur des Universités, Université de Limoges

Rapporteurs

M. Pierre BUSSON, Directeur de Recherche, CNRS / Gustave Roussy

M. Philippe GAULARD, Professeur des Universités, Inserm

Examineurs

Mme. Evelyne MANET, Directeur de Recherche, ENS de Lyon

M. Arnaud JACCARD, Professeur des Universités, Université de Limoges



A mon Père

A ma Mère

A ma Sœur

A mon Frère

*“ Ce qui te manque,
cherche-le dans ce que tu as ... ”*

Sagesse bouddhiste.

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 tiens à exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de thèse, **Sylvie ROGEZ**, pour m'avoir encadré, formé et supporté durant ces années. Je vous remercie pour vos compétences, tous vos conseils, nos discussions, nos rires et votre grande humanité. Merci de ne m'avoir jamais laissé tomber malgré les situations difficiles que j'ai vécues. Votre phrase d'encouragement « on va y arriver » va rester dans ma tête durant toute ma vie !

Mes remerciements s'adressent également à notre chef d'équipe, **Jean FEUILLARD**, qui m'a accueilli dans son équipe durant ma thèse. Je vous remercie aussi pour vos encouragements et vos conseils professionnels durant les réunions de labo.

Je voudrais également remercier mon co-directeur au Liban, **Mohamad Adnan HALABI**, pour sa confiance en moi et pour m'ouvrir l'opportunité de venir en France.

Merci aux membres du jury, **Pierre BUSSON** et **Philippe GAULARD** d'avoir accepté d'être rapporteurs. Merci à **Evelyne MANET** et **Arnaud JACCARD** d'avoir accepté d'être examinateurs et merci de nouveau à **Jean FEUILLARD** d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.

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

Je remercie aussi **Eden LEBRAULT** pour les dosages de bioanalyseur et pour les discussions qu'on fasse de temps en temps.

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

Un grand merci à mes collègues, **Léa et Stécy**, pour les bons moments partagés même si c'étaient faible !! Merci aussi à **Léa** pour nos discussions et surtout pour les mentions sur Facebook, qui me laisse rire malgré tout.

Je remercie également mes voisines dans le bureau, **Kenza et Milène**. Vous êtes incroyables avec un esprit amusant. Je vous souhaite le succès dans votre vie.

Je tiens à remercier aussi **Quentin, Catherine et Roussine** pour les temps magnifiques passés durant les déjeuners.

Je remercie mes collègues Jennifer, Charlotte, Morgane, Audrey, et les libanais, Iman, Zeinab, Nour, Leena, Hussein I, Hussein A, Hassan, Roy, Hanadi, Zeina, Suzane et May pour les bons moments que nous avons passés ensemble ainsi que pour leur amitié.

Je tiens à remercier aussi **Jacque** pour ton hospitalité et surtout pour ton cappuccino délicieux.

Un remerciement spécial pour **Rayan**. C'est vrai que je ne te connais pas depuis longtemps, mais tu as une âme légère et agréable qui a devenu un caractère rare dans nos jours. Ta façon de parler et de discuter avec les gens te laisse entrer dans les cœurs de tout le monde. Reste comme toi avec ta bonne humeur.

Un grand merci à mon amie **Layla**. On a passé beaucoup du temps ensemble et on a partagé des souvenirs à Limoges et en même temps à Carcassonne qui vont rester gravés dans ma tête. Je te remercie d'être à mes côtés durant la rédaction de ma thèse. Je te remercie d'être dans ma vie, j'ai beaucoup de chance de t'avoir et je te souhaite tout le bonheur possible !

J'adresse mes sincères sentiments à ma deuxième famille, **Omar** et **Iman**, pour leur assistance et leur soutien durant mon séjour à Limoges.

Mes derniers remerciements vont, de mon cœur, à mes parents pour leur amour, leur soutien et leurs encouragements constants à travers tous les problèmes et les challenges auxquels j'ai été confronté, et pour avoir non seulement la confiance en moi lorsque je me suis lancée dans cette aventure, mais aussi pour m'avoir soutenue à chaque étape depuis le début.

Enfin, je vous demande de m'excuser, ma langue me trompe à chaque fois que je voudrais exprimer mes sentiments. Sa situation est comme si j'étais impuissante, il ne sait pas comment exprimer les mots sincères...

Nader BAYDA

« NB »

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Remerciements	5
Droits d'auteurs	7
Table des matières	8
Table des illustrations	11
Abréviations	12
Résumé	1
Abstract	2
Chapitre I: Introduction	3
Partie 1: Le virus d'Epstein-Barr	4
I. Généralités sur l'EBV	4
I.1. Découverte du virus	4
I.2. Classification du virus EBV	5
I.3. Epidémiologie de l'EBV	6
II. Structure du virus	7
III. Structure du génome viral	8
IV. Cellules cibles de l'EBV et cycle biologique de l'infection par le virus de l'EBV	10
IV.1. Cellules cibles de l'EBV	10
IV.2. Cycle biologique de l'infection par le virus de l'EBV	12
IV.2.1. Le cycle lytique	14
IV.2.2. Le cycle de latence	14
IV.2.2.1. Les différents types de latence	15
IV.2.2.2. Protéines, ARN et miARN viraux de l'EBV de latence	17
IV.2.2.2.1. Les protéines nucléaires de latence (EBNA)	17
A. EBNA-1	17
B. EBNA-2	18
C. EBNA-LP « EBNA-Leader Protein »	21
D. EBNA-3	21
IV.2.2.2.2. Les protéines membranaires de latence (LMP)	25
A. LMP-1	25
B. LMP-2	27
IV.2.2.2.3. Les ARN et miARN viraux de latence	29

A. BART (BamHI-A Rightward Transcripts).....	29
B. EBER	29
C. miARN	30
IV.2.3. La réactivation	31
V. Physiopathologie de l'infection par l'EBV.....	32
VI. Pathologies associées à l'EBV	34
VI.1. Lymphomes liés à l'EBV	34
VI.1.1. Lymphome de Burkitt (BL)	34
VI.1.2. Lymphome de Hodgkin (HL)	35
VI.1.3. Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL).....	37
VI.1.4. Lymphomes NK/ T.....	38
VI.1.5. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD).....	39
VI.2. Carcinomes liés à l'EBV	40
VI.2.1. Carcinome nasopharyngé (NPC)	40
VI.2.2. Carcinome gastrique (GC).....	41
VII. Lymphome T angio-immunoblastique (LAI).....	42
VII.1. Introduction	42
VII.2. Epidémiologie	43
VII.3. Architecture du ganglion lymphatique	43
VII.4. Mutations génétiques.....	44
VII.5. Relations entre LAI et EBV	45
VII.6. Traitement	46
Partie 2 : Les exosomes dérivés de cellules tumorales infectées par l'EBV (Les exosomes en tant que médiateurs de la communication intercellulaire).....	48
I. Vésicules extracellulaires et différents types de vésicules	48
II. Exosomes	49
II.1. La voie exosomale.....	50
II.2. Mécanismes d'entrée des exosomes libérés dans les cellules réceptrices	53
III. Constitution des exosomes	54
III.1. Acides nucléiques.....	56
III.2. Lipides et Protéines.....	57
IV. Fonctions des exosomes liés à l'EBV dans les cellules cibles.....	57
Chapitre II : Objectif du travail.....	61

Chapitre III : Publications	64
Article 1 : Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas	65
Article 2 : Epstein-Barr Virus Transcriptome in Exosomes of Human Lymphoma Cell Lines.....	68
Chapitre IV : Discussion générale.....	71
Chapitre V : Conclusions et Perspectives.....	78
Références bibliographiques	80

Table des illustrations

Figure 1. Le virus EBV photographié dans une portion d'un lymphoblaste cultivé, dérivé d'un lymphome de Burkitt.	4
Figure 2. Taxonomie de la famille des Herpesviridae et leurs représentants humains.	5
Figure 3. Structure du virus de l'EBV.	7
Figure 4. Schéma illustrant le génome de l'EBV sous la forme linéaire.	8
Figure 5. Génome de l'EBV sous sa forme épisomale avec la carte de restriction obtenue avec l'enzyme BamHI.	9
Figure 6. Cycle biologique de l'EBV.	13
Figure 7. Différents types de latence de l'EBV.	16
Figure 8. Structure de la protéine EBNA-1 avec les domaines fonctionnels.	17
Figure 9. Structure fonctionnelle de la protéine de latence EBNA-2.	19
Figure 10. Schéma représentant les fonctions de protéines EBNA.	24
Figure 11. Schéma représentant la structure et la fonction de LMP-1.	26
Figure 12. Schéma représentant la structure et la fonction de LMP-2.	28
Figure 13. Cycle d'infection par l'EBV : entre la primo-infection et l'établissement de la persistance.	33
Figure 14. Lymphome de Hodgkin avec les cellules de Reed-Sternberg.	36
Figure 15. Schéma représentant les différents types de vésicules extracellulaires.	49
Figure 16. Le processus de la biogenèse et de la sécrétion des exosomes.	50
Figure 17. Mécanismes dépendants et indépendants de l'ESCRT.	52
Figure 18. Différents types de mécanismes d'incorporation des exosomes dans les cellules réceptrices.	54
Figure 19. Schéma représentant la structure et la composition des exosomes.	55

Abréviations

A

aa : acides aminés

ABC : activated B cell

AID : activation-induced cytidine deaminase

AILD : angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia

Alix : ALG-2 interacting protein X

ANKL : aggressive NK leukemia

ARNInc : ARN longs non codants

B

Bak : BCL2 Antagonist/Killer

BART : Bam HI-A region rightward transcript

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl2 : B-cell lymphoma 2

BCL2L1 : Bcl-2-like protein 1

BCR : B-Cell Receptor

BHRF1 : Bam HI fragment H rightward open Reading frame I

BL : Burkitt lymphoma

Btk : tyrosine kinase Bruton

BTLA4 : B and T Lymphocyte Attenuator 4

C

CAEBV : chronic active EBV

CBF1 : C-promoter binding factor 1

CBNPC : cancers bronchiques non à petites cellules

CCC : Covalently Closed Circular

CCL3 : Chemokine Ligand 3

CCL4 : Chemokine Ligand 4

CDK-1 : Cyclin-dependent kinase 1

cHL : classic Hodgkin Lymphoma

CPA : cellules présentatrices d'antigènes

CRs : Conserved Regions

CTAR : Carboxy-Terminal Activating Regions

CXCL13 : C-X-C motif chemokine ligand 13

D

DBD/DD : DNA-binding and dimerization domain

DC : cellules dendritiques

DIM : domaine d'homodimérisation

DLBCL : Diffuse large B cell lymphoma

DLBCL-CI : DLBCL associated with chronic inflammation

DNMT3A : DNA Methyltransferase 3A

E

E : Early

EBER : Epstein-Barr encoded small RNA

EBF-1 : Early B cell factor

EBNA : EBV Nuclear Antigen

EBNA-LP : EBNA-Leader Protein

EBV : Epstein-Barr virus

EGFR : Epithelial Growth Factor Receptor

ENKTL : extranodal NK/T cell lymphoma

EPHA2 : EPHRIN A2

ERK1 : extracellular signal-regulated kinase 1

ESCRT : endosomal sorting complex required for transport

EV : extracellular vesicles

F

FasL : Fas ligand

FDC : Follicular dendritic cells

FGF-2 : fibroblast growth factor

FTCL : follicular T-cell lymphoma

G

gB : glycoprotéine virale B

GC : cancers gastriques Gastric Carcinoma

GCB : germinal center B cell

gH : glycoprotein heavy

GLUE : GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45

Gly-Arg : glycine-arginine

Gly-Gly-Ala : glycine-glycine-alanine

GM : gangliosides

Gp : glycoproteins

GPIIb : platelet glycoprotein IIb

H

H3K27me3 : Histone H3 Lysine 27 Tri-methylation

HAT : histones acétyltransférases

HCMV : Human cytomegalo virus

HDAC : histone deacetylase

HEV : High Endothelial Venules

HHV : Human herpes virus

HIF1 : Hypoxia-inducible factor-1

HL : Hodgkin's Lymphoma

HLA : human leukocyte antigen

Hrs : hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate

HRS : Hodgkin Reed-Sternberg

Hsc : Heat shock cognate

Hsp : heat shock proteins

HSV : Herpes simplex virus

I

IBL : immunoblastic lymphadenopathy

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule

ICOS : inducible T cell co-stimulator

ID3 : DNA-binding protein inhibitor ID3

IDH2 : isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+) mitochondrial

IE : Immediate Early

IFN : interféron

Ig : immunoglobuline

IGF-1 : insulin-like growth factor-1

IKK : IκB kinases

IL10 : interleukines de type 10

ILV : intraluminal vesicles

IM : Infectious Mononucleosis

IP10 : Interferon-Inducible Protein 10

IR : Internal Repeat

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

J

JAK/STAT : Janus Activated Kinase/ signal transducer and activator of transcription proteins

JNK/AP1 : c-Jun amino-terminal Kinase/activator protein-1

K

Kpb : Kilopaires de bases

KSHV : Kaposi sarcoma associated herpesvirus

L

L : Late

La : lupus antigen

LAI : Lymphome T angio-immunoblastique

Ld-cHL : Lymphocyte depleted cHL

LELC : Lymphoepithelioma-like carcinoma

LFA : Lymphocyte Function Associated Antigen

LMP : Latence Membrane Proteins

lncRNA : long non-coding RNAs

Lr-cHL : Lymphocyte rich cHL

M

MAPKK : mitogen-activated protein kinase kinase kinases

Mc-cHL : Mixed cellularity cHL

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

MDM2 : Mouse double minute 2 homolog

miARN : microARN

MMP9 : métalloprotéinase matricielle 9

MVB : multivesicular bodies

N

NHL : Non Hodgkin's Lymphoma

NICD : Notch intracellular domain

NIK : NF- κ B-inducing kinase

NK/T : lymphomes NK (Natural Killer) /T

NLPHL : Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma

NLS : nucleus localization sequence;

NOS : not otherwise specified

NOX2 : NADPH oxidase 2

NPC : Nasopharyngeal Carcinoma

nPTCL-T_{FH} : newly defined nodal PTCL with Tfh phenotype

NRP-1 : Neuropilins-1

Ns-cHL : Nodular sclerosing cHL

NTA : nanoparticle tracking analysis

O

ORF : Open Reading Frame

OriLyt : Origine de réplication lytique

OriP : Origine de réplication latente

ORR : Overall Response Rates

P

p38/MAPK : p38 Mitogen Activated Protein Kinase

PC : phosphatidylcholine

PDGFR α/β : Platelet Derived Growth Factor Receptor, alpha or beta polypeptide

PE : phosphatidyléthanolamine

PEL : plasmacytoma primary effusion lymphoma

PI : phosphatidylinostol

PI(3)P : phosphatidylinositol-3-phosphate

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PI3KCA : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha

PKC : protéine kinase C

PKR : Protein kinase RNA-activated

PML-NB : Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies

pré-mi-ARN : précurseurs de miRNA

PS : phosphatidylsérine
PTCL-NOS : peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
PTEN : phosphatase and tensin homologue
PTK : protein tyrosine kinases
PTLD : Post-Transplant Lymphoproliferative Disease
PUMA : p53 Up-regulated Modulator of Apoptosis
PY : phosphotyrosine

R

RBP-J κ : recombinant binding protein JKappa
RC : complete response
REAL : Revised European and American Lymphoma classification
RG : arginine-glycine
RHOA : GTPase ras homology family member A
RPL22 : ribosomal protein L22

S

SCID : Severe combined immunodeficiency
SEP : sclérose en plaques
SKIP : Ski interacting protein
STLC : systemic EBV-positive T-cell lymphoma of childhood
SWI/SNF : SWItch/Sucrose Non-Fermentable
SYK : Spleen Associated Tyrosine Kinase

T

TAD : Transactivation Domain
TAP : transporter activated peptide
Tc : T cytotoxic lymphocytes

TCF-3 : T Cell Factor -3
TCR : T-cell receptor
TEM : transitions épithélio-mésenchymateuses
TET2 : tet methylcytosine dioxygenase 2
Tfh : follicular T helper
TfR : Transferrin receptor
TGF : Transforming growth factor
TGF- β : Transforming Growth Factor of B cells

Th : T helper lymphocytes
TNF : tumor necrosis factor
TNFR : tumour necrosis factor receptor
TNF- α : tumor necrosis factor α
TR : Terminal Repeat
TRADD : TNF Receptor Associated Death Domain
TRAF : TNF-receptor associated factor
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand

TSG : tumor susceptibility gene

U

U_L : Unique Long
U_s : Unique Short
USP7 : Ubiquitin-specific-processing protease 7

V

VEGF : Vascular endothelial growth factor
vIL10 : interleukine 10 viral
Vps4 : vacuolar protein sorting associated protein 4A

VSIG4 : V-set and immunoglobulin domain containing 4

VZV : Varicella zoster virus

W

WWTR1 : WW domain containing transcription regulator 1

α KG : α -ketoglutarate

Résumé

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), herpèsvirus oncogène, est associé à des carcinomes et lymphomes B ou T. Le lymphome T angio-immunoblastique (LAI) porte l'EBV dans 90% des cas sans qu'on sache quel rôle il y joue. Les exosomes, petites vésicules liées à la membrane, transportent un grand nombre de molécules pour favoriser la communication intercellulaire. L'EBV pourrait utiliser les exosomes pour contribuer au développement et à la dissémination de néoplasies.

Afin d'éclaircir ces points, nous avons étudié le transcriptome de l'EBV dans les adénopathies de 14 LAI et 21 autres lymphomes B et T, ainsi que de 11 lignées cellulaires, puis dans les exosomes de ces mêmes lignées. Un séquençage de nouvelle génération (NGS) avec technique de capture des ARN viraux a été réalisé. Les « reads » obtenus ont été alignés contre le génome de l'EBV et normalisés en transcrits par million (TPM).

Les transcrits BART étaient les transcrits de latence les plus exprimés dans les LAI suggérant qu'ils jouent un rôle dans cette pathologie. Les LAI présentaient une latence de type IIc avec expression de *BNLF2a* et des protéines de latence II. L'expression simultanée de *BCRF1*, interleukine-10 virale, et de *BNLF2a*, bloquant la présentation antigénique aux lymphocytes T cytotoxiques, pourrait participer à la survie des cellules tumorales infectées. Les transcrits de *BNLF2a* et *BKRF4*, protéines impliquées dans l'immunoévasion, ont été trouvés en abondance dans les exosomes de toutes les lignées. Les transcrits d'autres gènes, codant des protéines impliquées dans l'immunoévasion ou dans la prolifération cellulaire, ont aussi été trouvés à un taux élevé dans les exosomes de la plupart des lignées.

Les résultats obtenus laissent envisager une participation de l'EBV à la pathologie du LAI. Le virus pourrait utiliser les exosomes pour transporter des molécules permettant de renforcer sa participation dans l'oncogenèse et sa fonction dans l'échappement au système immunitaire.

Mots-clés : virus d'Epstein-Barr, EBV, lymphome T angio-immunoblastique, LAI, exosome, immunoévasion, oncogenèse, séquençage, NGS.

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV), an oncogenic herpesvirus, is associated with carcinomas and B or T lymphomas. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is associated with EBV in 90% of cases, but its role is unknown. Exosomes, small membrane-bound vesicles, carry a large number of molecules to promote intercellular communication. The EBV could use exosomes to contribute to the development and dissemination of neoplasms.

To clarify these points, we studied the EBV transcriptome in adenopathies of 14 AITLs and 21 other B and T lymphomas, as well as 11 cell lines, then in exosomes of the same cell lines. Next-generation sequencing (NGS) with capture technique of viral RNAs was performed. The reads obtained were aligned against the EBV genome and normalized to transcripts per million (TPM).

BART transcripts were the most expressed latency transcripts in AITLs, suggesting they play a role in this pathology. AITLs showed a latency type IIc with BNL2a expression and latency II proteins. Simultaneous expression of BCRF1, a viral interleukin-10, and BNL2a, which blocks antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes, may be involved in the survival of infected tumor cells. Transcripts of BNL2a and BKRF4, proteins involved in immunoevasion, were found in abundance in exosomes of all cell lines. Transcripts of other genes, which encode proteins involved in immunoevasion or cell proliferation, were also found at high levels in exosomes of most cell lines.

These results suggest the involvement of EBV in the pathology of AITL. The virus could use exosomes to transport molecules in order to reinforce its participation in oncogenesis and its function in immune escape.

Keywords: Epstein-Barr virus, EBV, angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITL, exosome, immunoevasion, oncogenesis, sequencing, NGS.

Chapitre I: Introduction

Partie 1: Le virus d'Epstein-Barr

I. Généralités sur l'EBV

I.1. Découverte du virus

Le lymphome de Burkitt (BL, *Burkitt Lymphoma*), un lymphome malin prévalent affectant les enfants en Afrique équatoriale a été décrit pour la première fois par Denis Burkitt en 1958 (Burkitt, 1958). Étant donné que la prévalence géographique du BL semblait dépendre de la température et de la pluviométrie, on soupçonnait que la malignité était associée à un agent biologique pathogène ou un virus transmis par un insecte.

En 1964, Anthony Epstein, Yvonne Barr et Bert Achong ont cultivé avec succès des cellules de lymphome à l'aide de biopsies tumorales fournies par Denis Burkitt et ont découvert des particules de type herpèsvirus en microscopie électronique (**Figure 1**). Ce nouveau virus s'est avéré être de structure similaire aux herpèsvirus, et a donc été caractérisé comme un nouveau membre de la famille des *Herpesviridae*, qui a ensuite été nommé virus d'Epstein-Barr (EBV, *Epstein-Barr Virus*). L'EBV a été le premier virus soupçonné d'être impliqué dans des tumeurs humaines en raison de sa capacité à transformer les lymphocytes humains fœtaux en cellules à prolifération continue (M. A. Epstein, B. G. Achong, 1964; Epstein, 2012).

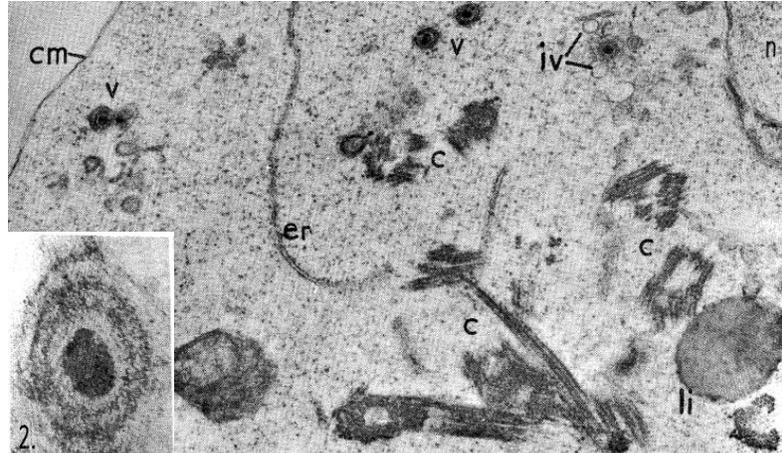


Figure 1. Le virus EBV photographié dans une portion d'un lymphoblaste cultivé, dérivé d'un lymphome de Burkitt.

La membrane cellulaire (cm) est visible au niveau du coin supérieur gauche et le noyau (n), se situe en haut à droite. Entre les deux, le cytoplasme contient plusieurs particules virales matures (v) dans des espaces entourés de membranes cellulaires fines, quelques particules immatures (iv) et des cristaux (c) coupés dans différents plans; on peut également voir un gros corps lipidique (li) et du réticulum endoplasmique (er). De plus, des ribosomes libres abondants sont dispersés dans toute la matrice cytoplasmique. (2) Une particule virale mature de diamètre entre 110-115 nm, située dans le cytoplasme et séparée par une petite membrane. Le nucléoïde est fortement coloré avec l'acétate d'uranyle. D'après (M. A. Epstein, B. G. Achong, 1964).

Les tests sérologiques ont révélé que l'EBV n'était pas limité géographiquement aux zones endémiques comme l'Afrique subsaharienne, mais qu'il était répandu dans toutes les populations testées, et que la prévalence augmentait avec l'âge (M. A. Epstein, B. G. Achong, 1964).

Dans les années 1970, deux équipes ont indépendamment mis en évidence la présence de génomes d'EBV dans des cellules de BL et de carcinome du nasopharynx (NPC, *Nasopharyngeal Carcinoma*), ce qui constituait un autre argument pour un lien étiologique entre l'EBV et certains cancers (Gunn et al., 1970; HAUSEN et al., 1970). Depuis, la participation de l'EBV a été démontrée dans de nombreuses tumeurs, comme les lymphomes des cellules NK/T (NK, *Natural Killer*), les lymphomes hodgkiniens (HL, *Hodgkin's Lymphoma*), les lymphomes non hodgkiniens (NHL, *Non Hodgkin's Lymphoma*), le carcinome du nasopharynx et certains cancers gastriques (GC, *Gastric Carcinoma*) (Ko, 2015).

1.2. Classification du virus EBV

La famille des *Herpesviridae* est une famille de plus de 100 virus connus qui infectent les animaux ou les humains. Les herpesvirus humains comprennent 8 membres, qui sont répartis en 3 sous-familles selon leurs propriétés biologiques : les *alpha-Herpesvirinae*, les *bêta-Herpesvirinae* et les *gamma-Herpesvirinae* (Zheng et al., 2019) (**Figure 2**).

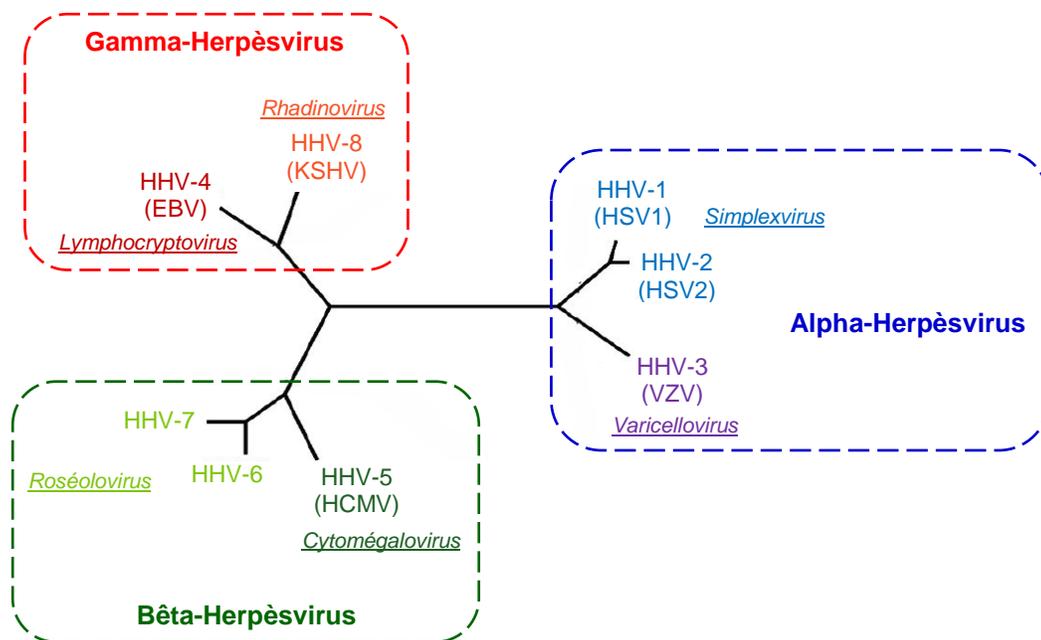


Figure 2. Taxonomie de la famille des Herpesviridae et leurs représentants humains.

HHV : Human herpes virus ; HSV : *Herpes simplex virus* ; VZV : *Varicella zoster virus* ; EBV : *Epstein-Barr virus* ; HCMV : *Human cytomegalovirus* ; KSHV : *Kaposi sarcoma associated herpesvirus*. Modifié d'après (Antman and Chang, 2000).

L'EBV, également connu sous le nom d'herpès virus humain de type 4 (HHV-4), est classé dans la sous-famille des *γ-Herpesvirinae* et doit être considéré comme le prototype du genre *Lymphocryptovirus*. Chez l'homme, deux grands types d'EBV ont été détectés, respectivement l'EBV de type 1 (EBV-1, ou type A) et l'EBV de type 2 (EBV-2, ou type B) qui diffèrent principalement par la séquence de certains gènes *EBV Nuclear Antigen* (EBNA), particulièrement les gènes *EBNA-2*, *EBNA-3A*, *EBNA-3B* et *EBNA-3C* (Romero-Masters *et al.*, 2020). L'EBV de type 1 a été séquencé à partir de la souche B95.8, produite par des lymphocytes B de marmouset transformés par le virus de l'EBV provenant d'une lignée cellulaire spontanément établie d'un patient atteint de IM et appelée 883L, tandis que le type 2 a été séquencé à partir de la souche AG876, qui était dérivée d'une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt africain. Ces deux types ont une répartition géographique distincte. L'EBV-1 est endémique dans le monde entier, tandis que l'EBV-2 est présent en Afrique sub-saharienne et en Nouvelle-Guinée. Les deux types diffèrent aussi dans leur capacité à immortaliser les lignées cellulaires, le type EBV-2 étant moins performant dans ce domaine que l'EBV-1, probablement en raison de mutations dans le gène EBNA-2 (Skare *et al.*, 1982; Baer *et al.*, 1984; Correia *et al.*, 2017).

1.3. Épidémiologie de l'EBV

L'EBV est le premier virus humain découvert en association avec le cancer. Ce virus, ubiquitaire, est l'un des virus les plus courants dans la population générale humaine qui infecte plus de 95% de la population mondiale (Zhang *et al.*, 2020).

Dans les pays en développement, les enfants s'infectent au cours des cinq premières années de leur vie, tandis que dans les pays développés, cet événement est généralement reporté à l'adolescence. L'infection est généralement asymptomatique, mais dans certains cas, (adolescents, adultes) elle provoque une mononucléose infectieuse (IM, *Infectious Mononucleosis*), une maladie non maligne associée à la primo-infection par l'EBV, qui régresse généralement en 2 semaines en laissant une grande asthénie résiduelle. Le virus persiste alors à vie chez les patients, sous forme d'une infection asymptomatique, dans laquelle il est trouvé sous forme latente. Le signe d'infection antérieure par l'EBV est objectivé par la détection d'anticorps chez plus de 95 % des adultes dans le monde entier (Correia *et al.*, 2018).

Il existe une différence significative dans la distribution géographique des génotypes de l'EBV. Les deux principaux types d'EBV décrits chez l'homme, les types 1 et 2, varient dans les gènes qui codent certaines protéines nucléaires dans les cellules infectées en latence. Cette variation a déjà été mentionnée dans la section " 1.2. Classification du virus EBV ".

L'EBV est transmis la plupart du temps par les sécrétions oro-pharyngées. Chez les adolescents et les adultes, les baisers intimes constituent la principale voie de transmission, alors que la salive sur les jouets et les doigts, par exemple, est considérée comme la principale voie de transmission chez les enfants. La transmission transplacentaire et par le lait maternel a été signalée dans de rares circonstances, et elle est considérée comme un mode de transmission non significatif. L'EBV peut également se propager par la transfusion sanguine, la transplantation non significatif. L'EBV peut également se propager par la transfusion sanguine, la transplantation d'organes ou la greffe de cellules souches hématopoïétiques (Maria K. Smatti *et al.*, 2018).

II. Structure du virus

L'EBV possède une morphologie similaire à celle de tous les *Herpesviridae*. Le virion, sphérique, mesure entre 120 et 200 nm de diamètre et possède au centre un nucléoïde constitué d'ADN génomique sous forme double brin, linéaire, enroulé autour de protéines. Cet ensemble est protégé par une capsidie qui est une structure protéique à symétrie icosaédrique formée de 162 capsomères. L'ensemble nucléoïde-capsidie constitue la nucléocapsidie entourée d'une couche de phospho-protéines virales et cellulaires, appelée tégument. Ces protéines sont impliquées non seulement dans les étapes de maturation du virion, mais aussi dans l'infection primaire *de novo* (Sathish, Wang and Yuan, 2012; Maria K. Smatti *et al.*, 2018). En effet, parce que les protéines de tégument sont libérées peu après l'infection dans le cytoplasme, elles jouent un rôle majeur dans l'infektivité en modulant l'environnement intracellulaire (Konishi *et al.*, 2018). Le tégument viral est surmonté d'une enveloppe externe composée d'une bicouche lipidique, dérivée des membranes cellulaires, et contenant des glycoprotéines (gp) virales responsables de l'interaction du virus avec la cellule hôte, donc impliquées dans l'infection, telles que les glycoprotéines gp350/220, gp85 (homologue de gH, *glycoprotein heavy*, d'HHV-1), gp25 (homologue de gL, *glycoprotein light*, d'HHV-1) et gp42 (Maria K. Smatti *et al.*, 2018) (**Figure 3**).

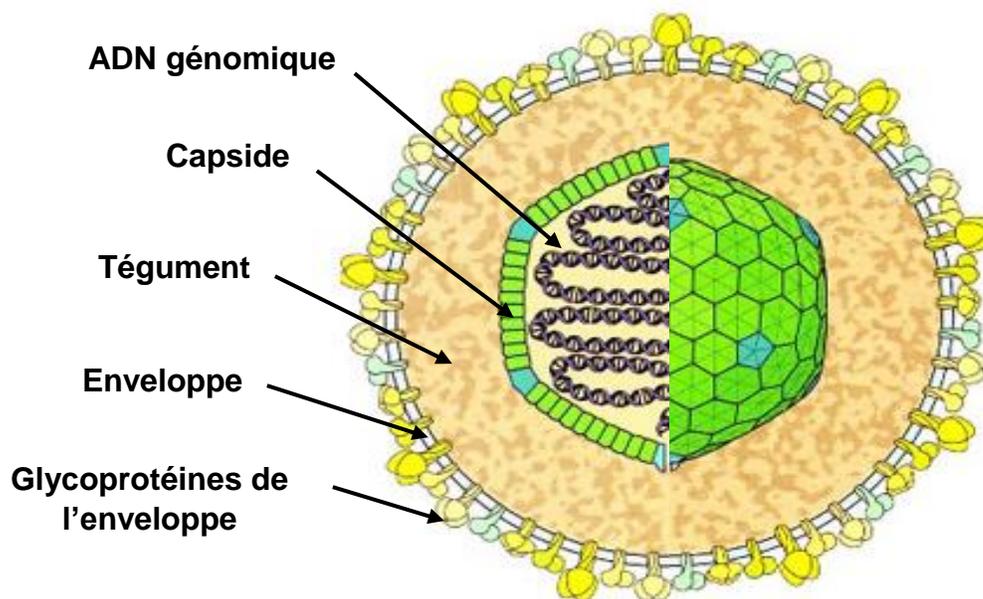


Figure 3. Structure du virus de l'EBV.

Schéma adapté du site web (https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/The_Role_of_Epstein-Barr_Virus_in_Burkitt%27s_Lymphoma).

III. Structure du génome viral

Dans la particule virale, le génome de l'EBV est une molécule d'ADN linéaire bicaténaire d'environ 172 kilopaires de bases (kpb) de longueur qui code plus de 85 gènes (Maria K Smatti *et al.*, 2018) (**Figure 4**). Il possède des régions internes répétées (IR, *Internal Repeat*), IR1, 2, 3 et 4, divisant le génome en parties (Ok *et al.*, 2013). Ce génome se compose donc de deux régions de séquences uniques, désignées par U_S (Unique Short) de 12 kbp, comprenant la région U1, et U_L (Unique Long) de 150 kbp, elle-même divisée en quatre régions individuelles U2, U3, U4 et U5 grâce aux séquences répétées internes (Graham S. Hudson *et al.*, 1985; Straus and Cohen, 1993; Young *et al.*, 2007). De plus, le génome contient des séquences répétées à ses deux extrémités (TR, *Terminal Repeat*) d'une taille d'environ 540 pb (Maria K Smatti *et al.*, 2018).

Près de l'IR2 et de l'IR4, le génome possède deux régions similaires de 1 kbp appelées DL et DR qui se composent de séquences répétitives et qui contiennent les deux origines de réplication lytique fonctionnelles de la phase productive (OriLyt). Néanmoins, l'ADN viral peut également se répliquer à partir d'autres origines telles que l'origine de réplication du plasmide (OriP), qui est l'origine d'une réplication latente. Celle-ci permet le maintien de la forme épisomale du virus latent dans la cellule infectée, dans laquelle le génome de l'EBV se répliquera d'une façon synchronisée avec le génome cellulaire lors de la phase S du cycle cellulaire (Hammerschmidt and Sugden, 1988).

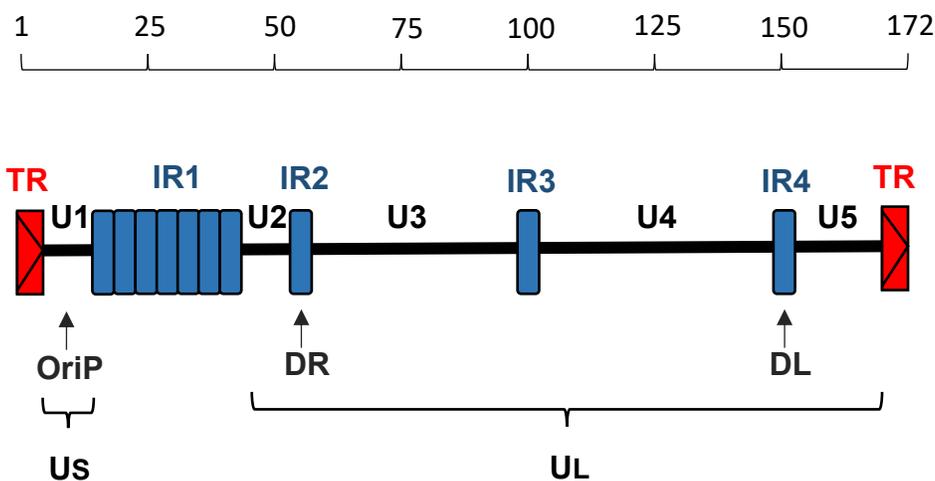


Figure 4. Schéma illustrant le génome de l'EBV sous la forme linéaire.

TR : terminal Repeat ; U : région unique (U1-U5) ; US : Unique Short ; UL : Unique Long ; IR : Internal Repeat (IR1-IR4) ; OriP : origine de réplication latente ; DL et DR : origines de réplication lytique. Inspiré d'après (Manet, Sergeant and Gruffat, 2003).

Durant l'infection cellulaire, les TR permettent au génome de l'EBV de former un épisome circulaire (CCC, *Covalently Closed Circular*) et de lier fortement à la chromatine de la cellule hôte sans s'intégrer dans le génome cellulaire (**Figure 5**). Cette circularisation du génome de l'EBV conduit également à des polymorphismes dans le nombre de répétitions. En raison du nombre de motifs dans les TR (4 à 12 d'une séquence de 500 pb, en tandem), il est possible de déterminer

si l'infection par l'EBV est monoclonale ou polyclonale dans les cellules infectées (Hammerschmidt and Sugden, 1988; Maria K Smatti *et al.*, 2018). Par contre, dans de très rares cas, le génome de l'EBV s'intègre dans le génome de la cellule hôte.

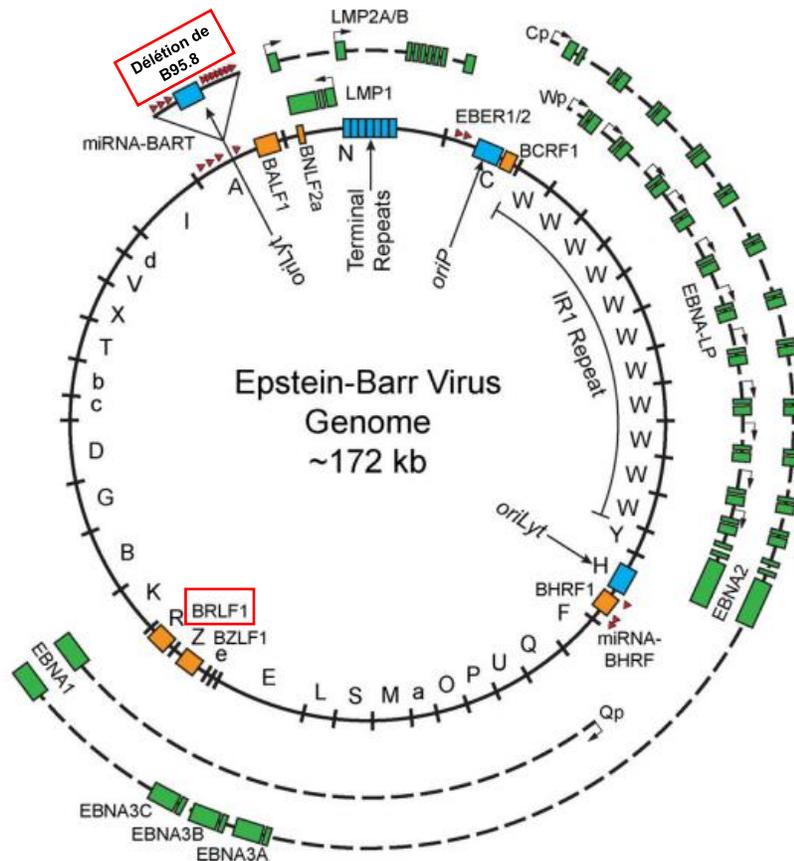


Figure 5. Génome de l'EBV sous sa forme épisomale avec la carte de restriction obtenue avec l'enzyme BamHI.

Les fragments de digestion BamHI sont indiqués par les lettres sur le bord interne du génome circulaire. Les carrés bleus représentent l'origine de la réplication plasmidique (oriP), les deux origines de la réplication lytique (OriLyt) et les répétitions terminales (TR) formées lorsque le génome linéaire est circularisé. Les cases orange indiquent les gènes lytiques qui sont actifs juste après l'infection dans la phase pré-latente. Selon le type de la latence et le moment après l'infection, les transcrits latents de l'EBV peuvent être activés par différents promoteurs : le promoteur W (Wp), le promoteur C (Cp), le promoteur Q (Qp, latence I uniquement) et les promoteurs LMP sont marqués. Des cases vertes indiquent les exons qui codent pour les gènes de latence et les lignes pointillées montrent les introns des pré-ARNm de ces gènes. Les triangles rouges représentent les ARN non codants de l'EBV, tels que le cluster miR-BHRF1, le cluster miR-BART et les EBER. La délétion de B95.8 contient la majorité des miR-BART et OriLyt. EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigens [EBNA-LP (Leader Protein) ; -1 ; -2 ; -3A ; -3B et -3C] ; LMP : Latence Membrane Proteins (LMP-1 ; -2A et -2B) ; EBER : EBV Encoded RNA (EBER-1 et -2) ; BRLF1 : BamHI R leftward frame 1. Modifié d'après (Price and Luftig, 2014).

L'EBV contient dans son génome, d'une part des gènes codant pour les protéines lytiques, qui sont spécialement des enzymes nécessaires pour la transcription et la réplication du génome viral et des protéines de structure, et d'autre part des gènes codant pour les protéines de latence, qui permettent la persistance du virus dans la cellule en absence de réplication virale (Maria K Smatti *et al.*, 2018).

Quatre promoteurs (Wp, Cp, Qp et Fp) déterminent lesquelles des protéines EBNA sont exprimées au niveau du génome de l'EBV (**Figure 5**). Dans le même temps, les protéines LMP (*Latence Membrane Proteins*) sont produites après l'activation de leurs promoteurs situés près des répétitions terminales dans le fragment BamHI Nhet du génome. L'expression de ces protéines reflète le statut du cycle de l'EBV dans les cellules infectées (lytique ou en latent) (Brooks *et al.*, 1992; Young and Rickinson, 2004; Szymula *et al.*, 2018).

L'EBV est le premier herpèsvirus dont le génome a été entièrement cloné dans *Escherichia coli* (Dambaugh *et al.*, 1980). Quelques années plus tard, le génome a été totalement séquencé à partir de la lignée cellulaire « B95.8 ». Le séquençage a permis de détecter des cadres de lecture ouverts (ORF, *Open Reading Frames*) classés, après fragmentation de l'ADN viral par l'enzyme de restriction BamHI, par taille décroissante et en suivant l'ordre alphabétique, de A à Z (**Figure 5**). Le nom de ces ORF commence par la lettre B, correspondant au préfixe BamHI, suivie de la lettre correspondant au fragment concerné, puis l'orientation de la transcription (vers la droite: *rightward* ou vers la gauche: *leftward*), enfin le cadre de lecture (*frame*) (Maria K Smatti *et al.*, 2018). Par exemple, BamHI R leftward frame 1 s'écrit BRLF1.

Le génome de B95.8 présente une délétion de 11.8 kb par rapport au génome connu de Raji, lignée issue d'un lymphome de Burkitt. Cette délétion est composée d'une des deux OriLyf, des gènes *LF2*, *LF3* et d'une partie du gène *LF1*, ainsi que de gènes codant des miARN. En raison de l'absence du fragment de 11.8 kb dans le génome de B95.8, une séquence hybride a été assemblée pour inclure ce fragment délété de la souche Raji (Parker *et al.*, 1990) et aboutir à la séquence de référence actuelle RefSeq HHV4 (EBV) sequence NC_007605 (Tzellos and Farrell, 2012).

Outre les ORF, le génome de l'EBV code pour des ARN latents non codants, les EBER (*Epstein-Barr encoded small RNA*) et des miARN : les miR-BART (BART, *Bam HI-A region rightward transcript*) et les miR-BHRF1 (BHRF1, *Bam HI fragment H rightward open Reading frame 1*) (Iwakiri, 2016).

IV. Cellules cibles de l'EBV et cycle biologique de l'infection par le virus de l'EBV

IV.1. Cellules cibles de l'EBV

Le virus de l'EBV est associé à plusieurs types de tumeurs malignes telles que des carcinomes ou des lymphomes. Ceci reflète le type de cellules hôtes de l'EBV : on peut distinguer d'une part les cibles conventionnelles qui sont majoritairement infectées et constituées des

cellules épithéliales et des lymphocytes B, et les cibles non conventionnelles qui sont rarement infectées telles que les cellules T, les cellules NK, ou encore les monocytes, les cellules folliculaires dendritiques et les neutrophiles.

Les glycoprotéines virales de l'EBV ont un rôle principal dans l'entrée et l'internalisation de l'EBV dans les cellules cibles. L'infection des lymphocytes B par l'EBV est initiée par l'interaction de la glycoprotéine principale de l'enveloppe de l'EBV, gp350/220, avec le récepteur CD21 de la cellule B correspondant au récepteur 2 du complément (*complement receptor 2*) ou CD35 correspondant au récepteur 1 du complément (*complement receptor 1*). Cette interaction stimule l'activation de la cellule B et déclenche l'endocytose de ce virus (Neparidze and Lacy, 2014; Smith *et al.*, 2020). Le virus de l'EBV utilise ensuite d'autres glycoprotéines virales pour poursuivre son infection. La glycoprotéine d'enveloppe de l'EBV gp42 interagit avec le corécepteur de l'EBV présenté à la surface du lymphocyte B, les molécules HLA (*human leukocyte antigen*) de classe II. La gp42 se lie aussi à la glycoprotéine gH du complexe hétérodimère des glycoprotéines gH-gL (gp85-gp25). Ceci déclenche l'interaction essentielle entre les glycoprotéines gH-gL et la glycoprotéine virale gB qui assure la médiation de la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane endosomique du lymphocyte B et donc l'entrée de ce virus (Sathiyamoorthy *et al.*, 2017). Une fois l'EBV entré dans les cellules B, la nucléocapside est transportée dans le noyau des cellules infectées et le génome viral linéaire se circularise et se transforme en épisome ; il est maintenu sous cette forme de latence dans le noyau (Kutok and Wang, 2006; Chang *et al.*, 2015).

L'EBV infecte aussi les cellules épithéliales malgré l'absence des molécules HLA de classe II sur la membrane de celles-ci. De ce fait, le mécanisme d'infection de ces cellules par le virus EBV diffère de celui des cellules B. Certaines études suggèrent que l'accès aux cellules épithéliales par l'EBV se fait par endocytose (Wang *et al.*, 2015). La fixation de l'EBV sur les cellules épithéliales dépend de types de cellules et de l'expression de CR2. En cas de cellules épithéliales CR2 positifs, la fixation est faite par l'interaction de gp350/220 avec CR2. Tandis qu'en cas de cellules épithéliales CR2 négatifs, elle est médiée par l'interaction entre le complexe viral gH-gL et les intégrines cellulaires ($\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ et $\alpha\beta 8$) ou entre la protéine d'enveloppe transmembranaire, BMRF-2, et l'intégrine cellulaire $\alpha\beta 1$. Le processus de fusion nécessite la glycoprotéine gB de l'EBV qui peut interagir avec le récepteur neuropilins-1 (NRP-1). L'EBV utilise aussi la protéine membranaire EPHRIN A2 (EPHA2), qui se lie spécifiquement à la glycoprotéine gB et au complexe gH-gL de l'EBV, comme un récepteur essentiel d'entrée dans les cellules épithéliales. Mais ce virus peut aussi entrer dans les cellules épithéliales par fusion directe de la membrane virale avec la membrane plasmique de la cellule hôte. Il est probable que les deux voies d'entrée, l'endocytose ou la fusion directe, sont utilisées pour infecter les cellules, mais la voie utilisée dépend de divers facteurs, notamment de l'expression pertinente des récepteurs de l'EBV (Chen and Longnecker, 2019). D'autre part, l'EBV peut entrer indirectement dans les cellules épithéliales par un mécanisme qui s'appelle « le transfert d'infection » où ce virus se fixe sur la membrane des lymphocytes B mémoires déjà infectés, qui interviennent et font une liaison avec les cellules épithéliales par leur pôles basolatéraux (Zuo *et al.*, 2014). Tugizov et ses collègues ont montré que le virus de l'EBV peut infecter les cellules épithéliales par leur pôle apical et basolatéral, et que le virus peut se propager d'une cellule épithéliale à une autre par les pôles latéraux (Tugizov, Berline and Palefsky, 2003).

Par ailleurs, l'EBV est également capable d'infecter d'autres types de cellules *in vivo*, comme les cellules T, et les cellules NK. Mais ces infections semblent être des événements relativement rares (Kimura, Kawada and Ito, 2013). Les lymphocytes T matures paraissent exprimer faiblement le récepteur CD21, mais le virus a le potentiel d'infecter un petit groupe d'entre eux *in vitro*. Les niveaux d'expression de CD21 varient avec la maturation et le développement des lymphocytes T, mais l'expression transitoire est suffisante pour permettre la fixation et l'entrée de l'EBV. En plus, le chercheur Smith et ses collègues ont montré que l'EBV utilise la même glycoprotéine virale (CD21) et le même récepteur cellulaire (gp350) pour l'entrée dans les lymphocytes T et B (Smith *et al.*, 2020). Cependant, un autre mécanisme indépendant de récepteur membranaire CD21 a été proposé en 1988 pour l'entrée virale en utilisant des molécules homologues de CD21. Ceci est observé dans l'infection par l'EBV de nombreuses cellules T de type leucémiques lymphoblastiques CD21-négatives (Tsoukas and Lambris, 1988). Par contre, les cellules NK ne possèdent pas les molécules CD21 à leur surface, mais les molécules HLA de classe II (Tremplat *et al.*, 2002). Le processus de fixation de l'EBV et son entrée dans ces cellules sont mal compris. Les cellules NK, même les cellules T, ont la capacité d'acquérir des récepteurs CD21 qui se fait d'une façon fonctionnelle mais temporaire à partir d'une synapse biologique, résultat de l'interaction des lymphocytes B infectés et des cellules NK ou T pour l'activation de la réponse immunitaire (Kimura, Kawada and Ito, 2013; Barros *et al.*, 2019).

Enfin, Il a récemment été rapporté que le virus EBV pouvait infecter les monocytes, qui n'expriment pas CD21, bien que son mécanisme reste inconnu (Kimura, Kawada and Ito, 2013). De même, ce virus peut infecter d'autres types cellulaires comme les cellules folliculaires dendritiques et les neutrophiles (Münz, 2014).

IV.2. Cycle biologique de l'infection par le virus de l'EBV

Comme les autres virus de l'herpès, l'EBV a un cycle de vie biphasique. Il passe par deux cycles de vie distincts : le cycle de latence et le cycle lytique, qui se caractérisent par l'expression de différents gènes dans les cellules cibles humaines (**Figure 6**). Suite à la primo-infection, ce virus persiste de façon latente dans les cellules hôtes. Dans certaines conditions comme l'immunodépression, une inflammation importante, l'EBV peut réactiver et entrer dans le cycle lytique (Zhao *et al.*, 2019).

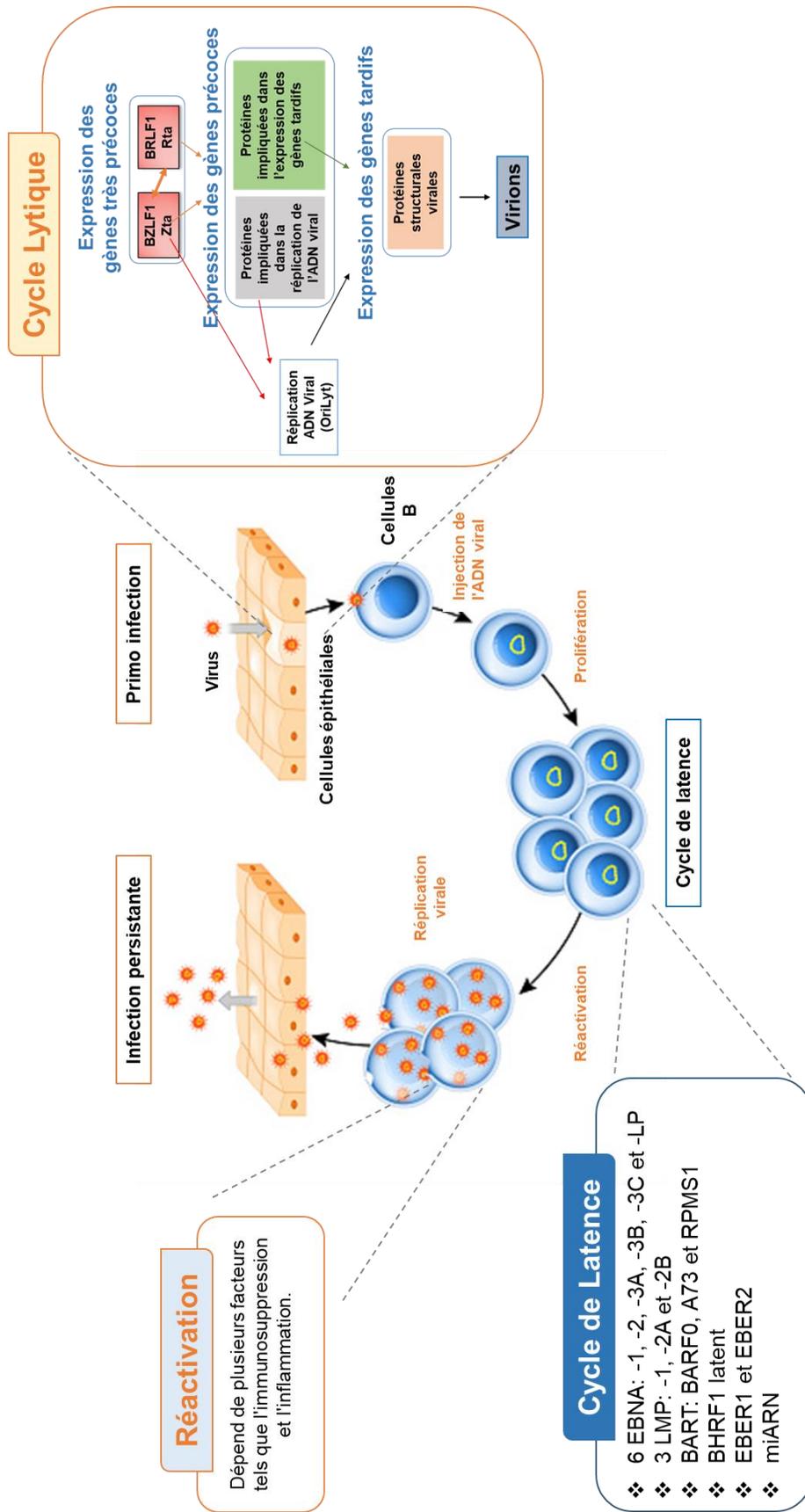


Figure 6. Cycle biologique de l'EBV.

Modifié d'après (CIRI, 2013) et (https://www.123rf.com/photo_128230684_stock-vector-epstein-barr-virus-life-cycle-ebv-replication-entry-to-the-cell-latency-and-reactivation-human-herpe.html)

IV.2.1. Le cycle lytique

Lors de la primo-infection, l'EBV subit son premier cycle lytique dans les cellules épithéliales orales. Pendant ce cycle, l'ADN linéaire viral se réplique à partir de l'origine de réplication OriLyt ; un grand nombre de gènes lytiques sont exprimés et des particules infectieuses de l'EBV sont produites, ce qui provoque la mort des cellules déjà infectées et permet de transmettre le virus de l'EBV d'une cellule hôte à l'autre (Murata, 2018).

Pendant l'infection lytique, le virus de l'EBV active plus de 80 gènes lytiques (Mckenzie and El-Guindy, 2015; Münz, 2019). Ces gènes sont exprimés en cascade : les gènes très précoces (IE, *Immediate Early*), suivis des gènes précoces (E, *Early*), et enfin les gènes tardifs (L, *Late*) (Li *et al.*, 2016; Ali *et al.*, 2022).

Les premiers gènes très précoces, BZLF1 et BRLF1, codent les protéines transactivatrices ZEBRA (BamHI Z Epstein-Barr virus Replication Activator) ou Zta, et Rta respectivement. La phosphorylation de ZEBRA entraîne l'activation de ZEBRA, ce qui permet la réplication lytique et la progression du cycle de vie du virus. ZEBRA est donc essentielle pour le lancement de la cascade lytique complète de l'EBV, et intervient dans la pathogenèse et l'infection de nouvelles cellules. Le rôle crucial de la protéine ZEBRA est dû à sa fonction d'activateur transcriptionnel des gènes précoces du cycle lytique de l'EBV. Le gène cible principal de ZEBRA est le gène BRLF1, conduisant à l'expression de Rta, qui, avec ZEBRA, entraîne l'activation des gènes lytiques en aval. Rta et Zta déclenchent en synergie l'expression de gènes lytiques précoces subséquents, qui codent les enzymes et les protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral. Au stade avancé du cycle lytique, après amplification de l'ADN viral, les gènes tardifs des protéines structurales virales comme la capsidite et les glycoprotéines sont exprimés (Concha *et al.*, 2012; Sivachandran, Wang and Frappier, 2012; Ali *et al.*, 2022).

Dans le noyau, les ADN viraux répliqués se regroupent dans les capsides et forment les nucléocapsides. Ces dernières bourgeonnent à travers la membrane nucléaire et acquièrent des enveloppements pour former des vésicules cytoplasmiques contenant le virus enveloppé. Ces vésicules fusionnent avec la membrane plasmique cellulaire et libèrent des particules virales nouvellement formées par exocytose.

IV.2.2. Le cycle de latence

Suite à la primo-infection, l'EBV infecte les cellules B naïves et entre dans la phase latente dans laquelle aucun virus infectieux n'est produit. A la différence du cycle lytique, pendant la latence le génome de l'EBV est maintenu en épisomes circulaires et seul un ensemble très restreint de gènes latents sont exprimés, ce qui augmente la capacité de ce virus à échapper au système immunitaire. Les gènes de latence exprimés perturbent la croissance normale des cellules B, et entraînent la prolifération et l'immortalisation cellulaire (Farrell, 2019).

IV.2.2.1. Les différents types de latence

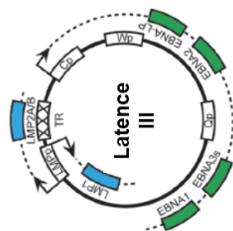
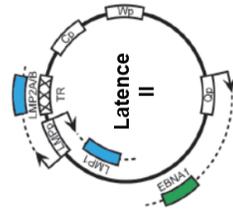
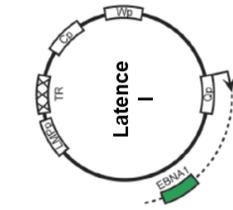
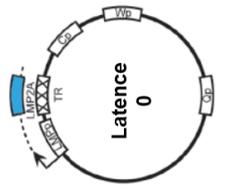
L'EBV à l'état latent exprime seulement un petit nombre de gènes appelés gènes de latence. Ces gènes codent pour les six protéines de latence EBNA (EBNA-1 ; -2 ; -3A ; -3B ; -3C et -LP (*Leader Protein*)) et les trois LMP (LMP-1 ; -2A et -2B), ainsi que les ARN BART, les ARN non codants EBER (EBER-1 et -2) et les miARN (Kang and Kieff, 2015; Farrell, 2019). Le virus décrit quatre phases de latence : III, II, I, et 0 durant lesquelles les gènes viraux sont exprimés d'une façon différente dans la cellule infectée (Grywalska and Rolinski, 2015) (**Figure 7**).

Latence de type III : elle est caractérisée par la production de toutes les protéines de latence, les EBNA et les LMP ainsi que les ARN viraux BART, EBER et les microARN (Grywalska and Rolinski, 2015). Cette forme de latence survient dans les cellules B au repos après la primo-infection par l'EBV, lorsque les protéines EBNA-2 et EBNA-LP sont exprimées par l'activation du promoteur Wp, ainsi que le BHRF1 latent. En 48 heures, tous les autres gènes des EBNA sont exprimés par le promoteur Cp (Marques-Piubelli *et al.*, 2020; Ranger-Rogez, 2021). Alors que l'expression des protéines LMP se fait après l'activation de leurs promoteurs. Cette latence favorise la transformation de la croissance des cellules B et l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes permanentes (LCL) (Kang and Kieff, 2015). Elle est trouvée dans les lymphomes des immunodéprimés (Marques-Piubelli *et al.*, 2020).

Latence de type II : au contraire de ce qui se passe dans la latence III, les promoteurs Wp et Cp sont silencieux, et la protéine EBNA-1 est exprimée par le promoteur alternatif Qp (Ranger-Rogez, 2021). Simultanément, les *LMP-1*, *-2A* et *-2B* sont toujours exprimés en présence d'ARN non codants. Ce type de latence se manifeste dans les NPC, HL et NK/TL (Grywalska and Rolinski, 2015).

Latence de type I : ce type de latence présente l'expression d'un seul gène de latence, *EBNA-1*, et la production des ARN non codants BART et EBER (Kang and Kieff, 2015). Les promoteurs Wp, Cp ainsi que les promoteurs de LMP sont tous silencieux, et la protéine EBNA-1 est exprimée par le promoteur alternatif Qp (Ranger-Rogez, 2021). Ceci est caractéristique de la plupart des tumeurs BL, des lignées dérivées de BL aussi bien que des cellules B mémoires au cours de la division cellulaire (Kang and Kieff, 2015).

Latence de type 0 : elle est caractérisée par la présence des ARN BART, EBER, des miRNA et éventuellement des transcripts LMP-2A avec absence d'expression de toutes les protéines virales. Ce type de latence est observée dans les lymphocytes B mémoires recirculants au repos chez des sujets sains. Ce manque d'expression des gènes viraux aide le virus à éviter la détection par le système immunitaire de l'hôte (Marques-Piubelli *et al.*, 2020).



Expression des Gènes Viraux :

Expression des protéines:	Expression des protéines:	Expression des protéines:	Expression des protéines:
EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, LMP-2A et LMP-2B	EBNA-1, LMP-1 et LMP-2	EBNA-1, LMP-1 et LMP-2	EBNA-1
Expression des ARN: BART EBER-1,2 miARN	Expression des ARN: BART EBER-1,2 miARN	Expression des ARN: BART EBER-1,2 miARN	Expression des ARN: LMP-2A
Pathologies: Lymphomes des immunodéprimés et LCL	Carcinome du nasopharynx, Lymphomes hodgkiniens et Lymphome NK/T	Cellules B mémoires, Lymphome de Burkitt et Lignées dérivées du BL	Lymphocytes B mémoires au repos

Figure 7. Différents types de latence de l'EBV.

Epstein-Barr Nuclear Antigens (EBNA-LP ; -1 ; -2 ; -3A ; -3B et -3C); LMP : Latence Membrane Proteins (LMP-1 ; -2A et -2B) ; EBER : EBV Encoded RNA (EBER-1 et -2) ; BART : Bam HI-A region rightward transcript. Inspirée d'après (Alexander M Price, 2015).

IV.2.2.2. Protéines, ARN et miARN viraux de l'EBV de latence

IV.2.2.2.1. Les protéines nucléaires de latence (EBNA)

A. EBNA-1

La protéine EBNA-1 est codée par le cadre de lecture ouvert *BKRF1* contenant la région de répétition IR3. En raison de polymorphismes dans cette région, le poids moléculaire d'EBNA-1 varie entre 65 et 85 kDa selon la souche virale (Ranger-Rogez, 2021). EBNA-1 est une protéine nucléaire phosphorylée de 641 acides aminés (aa). Elle contient des domaines riches en glycine-arginine (Gly-Arg) et en glycine-glycine-alanine (Gly-Gly-Ala), un site de liaison pour la localisation nucléaire (NLS, *nucleus localization sequence*) et un pour la protéase spécifique de l'ubiquitine (USP7, *Ubiquitin-specific-processing protease 7*), ainsi qu'un domaine de dimérisation et de liaison à l'ADN (Jiang *et al.*, 2018) (**Figure 8**).

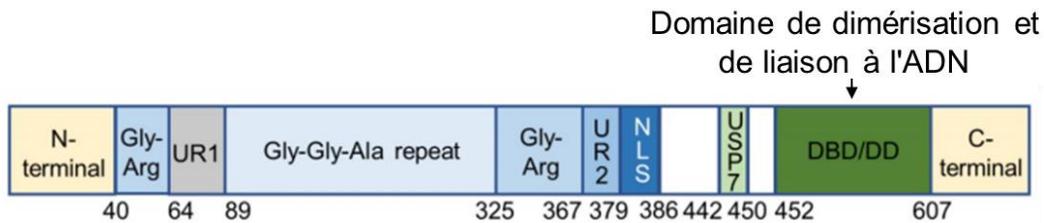


Figure 8. Structure de la protéine EBNA-1 avec les domaines fonctionnels.

UR1 et UR2 : région unique - Gly-Arg : glycine-arginine - Gly-Gly-Ala : glycine-glycine-alanine - USP7 : Ubiquitin-specific-processing protease 7 - NLS : nucleus localization sequence - DBD/DD : DNA-binding and dimerization domain. Modifiée d'après (Jiang *et al.*, 2018).

La protéine EBNA-1, exprimée dans toutes les cellules infectées par l'EBV, est détectée dans les latences de type I, II et III et pas dans la latence de type 0 (Marques-Piubelli *et al.*, 2020). Le gène EBNA-1 code une protéine pouvant être exprimée à partir de trois promoteurs viraux différents : Cp, Qp et Fp (Ranger-Rogez, 2021).

Pendant la phase initiale de la latence de type III, le gène EBNA-1 est transcrit à partir de Cp après circularisation du génome de l'EBV, tandis que pendant les latences de type I et II, dans lesquelles les promoteurs Wp et Cp sont désactivés par méthylation, le promoteur Qp peut prendre le relais de la transcription. Le promoteur Fp est actif durant le cycle lytique (Ranger-Rogez, 2021).

La protéine EBNA-1 est principalement présente dans le noyau des cellules infectées par l'EBV. La localisation nucléaire d'EBNA-1 est régulée par l'interaction entre la courte séquence NLS d'EBNA-1 et les protéines cellulaires importines de type α (protéines adaptatrices, $\alpha 1$ et $\alpha 5$) (Jiang *et al.*, 2018).

EBNA-1 est une protéine de liaison à l'ADN qui joue un rôle important dans la biologie du virus en latence. Il est nécessaire de maintenir et de reproduire le génome viral dans les lymphocytes B durant la division cellulaire. EBNA-1 se lie à l'origine de réplication du plasmide (oriP) en tant qu'homodimère avec de fortes spécificité et affinité, à travers un domaine de liaison à l'ADN situé à son extrémité C-terminale. Dans chaque cycle cellulaire, la machinerie de réplication de l'ADN cellulaire est recrutée à l'oriP par la protéine EBNA-1 et d'autres co-facteurs entraînant la réplication du génome de l'EBV avec les chromosomes de la cellule hôte (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018). L'extrémité N-terminale de la protéine EBNA-1 est faiblement liée à des sites aléatoires sur le chromosome de la cellule hôte pour empêcher la dégradation et assurer la distribution du génome de l'EBV aux cellules filles pendant la mitose (Smith and Sugden, 2013). *In vitro*, le génome de l'EBV peut être éliminé des lignées cellulaires BL infectées par l'EBV en inhibant la liaison de la protéine EBNA-1 à l'ADN (Li *et al.*, 2010).

EBNA-1 est également capable d'activer la transcription en se liant à Cp et aux promoteurs viraux des LMP (Ranger-Rogez, 2021). Il a été démontré qu'elle active la transcription du gène cellulaire *NOX2* (*NADPH oxidase 2*), une enzyme productrice de superoxydes formant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui contribuent à la cancérogenèse (S.-M. Kim *et al.*, 2017).

La protéine EBNA-1 contient des répétitions glycine-glycine-alanine (Gly-Gly-Ala) qui la rendent résistante à la dégradation par les protéases, évitant ainsi la présentation des épitopes EBNA-1 aux cellules T cytotoxiques. Ceci rend cette protéine de latence indétectable par les lymphocytes T et permet son expression persistante à tous les stades de latence (Saha and Robertson, 2019).

En outre, on pense que la séquence Gly-Gly-Ala induit le stress traductionnel, activant ainsi indirectement l'expression du proto-oncogène « Myc » par l'intermédiaire de la signalisation médiée par la phosphoinositide 3-kinase (PI3K). Cela est confirmé par l'inhibition du PI3Kδ dans certaines cellules de lymphome contenant de l'EBNA-1 et qui deviennent plus sensibles (Gnanasundram *et al.*, 2017).

Il a également été suggéré que l'interaction d'EBNA-1 avec la protéase USP7, peut modifier les niveaux d'expression du suppresseur de tumeur « p53 » ou du régulateur négatif de p53 « MDM2 » (*Mouse double minute 2 homolog*) dans les cellules, et qu'EBNA-1 peut réguler l'activité anti-apoptotique en provoquant la survie des lignées cellulaires de BL, indiquant que le rôle d'EBNA1 s'étend au-delà du maintien du génome de l'EBV dans les lymphocytes B infectés (Frappier, 2012a; Saha and Robertson, 2019).

B. EBNA-2

La protéine EBNA-2, codée par l'ORF *BYRF1*, est associée à la latence de type III. C'est la première protéine virale de latence produite, avec EBNA-LP, à partir du promoteur viral Wp, après l'introduction du génome viral dans le noyau de la cellule hôte. EBNA-2 entraîne l'activation du promoteur C viral en amont pour produire les transcrits de toutes les protéines EBNA

nécessaires à l'immortalisation des LCL. EBNA-2 active également l'expression des trois protéines LMP à partir de leurs promoteurs respectifs (Ranger-Rogez, 2021).

Basé sur la diversité des séquences des allèles EBNA-2 dans différentes souches d'EBV, il a été démontré qu'il existe deux variants : EBNA-2A et EBNA-2B, qui diffèrent par leur taille, EBNA-2A contenant 487 acides aminés, tandis que EBNA-2B en possède 443, définissant respectivement deux souches d'EBV, EBV-1 et EBV-2. Il a été montré que l'EBV-1 possède des propriétés plus transformatrices *in vitro*, ce qui serait dû à des mutations dans le gène EBNA-2 (Tzellos *et al.*, 2014).

La partie N-terminale d'EBNA-2 est formée d'un domaine d'homodimérisation (DIM, aa 1-58) suivi d'une région riche en proline (aa 58-97) et une région de taille variable selon le type de variant (135-280 dans la forme la plus longue, EBNA-2A). Cette partie permet à la protéine EBNA-2 d'exister sous forme d'homodimère *in vivo* ou *in vitro*. En outre, la partie C-terminale est constituée de 4 régions : une région qui interagit avec le facteur RBP-Jk (recombinant binding protein JKappa) aussi appelé CBF1 (C-promoter binding factor 1), une région riche en résidus arginine-glycine (RG, aa 341-355), une zone contenant le domaine de transactivation (TAD, *Transactivation Domain*, aa 437-475) et la dernière région contenant la séquence de NLS (aa 477-483) (Friberg *et al.*, 2015; Ranger-Rogez, 2021).

D'une façon fonctionnelle, la protéine EBNA-2 contient 9 régions conservées (CRs, *Conserved Regions*) (Harter *et al.*, 2016). Les domaines CR1, 2 et 7 sont requis pour l'activation de la protéine EBNA-LP. Les régions CR5 et 6 sont impliquées directement dans la liaison à RBP-Jk. Le domaine TAD et la séquence NLS sont situés respectivement en CR8 et 9. Tandis que les domaines CR3 et CR4 ont des rôles indéterminés (**Figure 9**).

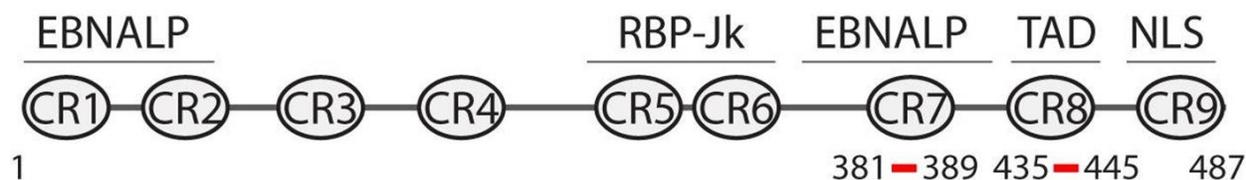


Figure 9. Structure fonctionnelle de la protéine de latence EBNA-2.

CR1-9 représentent les régions conservées - la protéine de latence EBNA-LP : EBNA-Leader Protein - RBP-Jk : recombinant binding protein JKappa - TAD, Transactivation Domain – NLS : nucleus localization sequence. D'après (Harter *et al.*, 2016).

EBNA-2 est un activateur transcriptionnel qui stimule la prolifération et la transformation des cellules B par reprogrammation épigénétique. EBNA-2 ne se lie pas directement à l'ADN, mais forme des complexes avec les protéines de liaison à l'ADN des cellules B et virales, telles que RBP-Jk, permettant l'accès aux éléments régulateurs des gènes (Lu *et al.*, 2016). RBP-Jk est une cible en aval de la voie de signalisation Notch qui dépend de la protéine Notch, un récepteur transmembranaire, et contrôle plusieurs processus cellulaires, notamment la différenciation, la prolifération et l'apoptose. RBP-Jk est activé par la liaison NICD (*Notch intracellular domain*). Des études ont montré que la protéine EBNA-2 peut remplacer

fonctionnellement NICD et activer RBP-Jk en son absence, rendant le récepteur Notch redondant (Lu *et al.*, 2016). Une étude récente a montré que les sites de liaison d'EBNA-2 sont enrichis en motifs EBF-1 (*Early B cell factor*) et qu'EBNA-2 peut se lier à EBF-1 pour former des complexes dans les cellules B, suggérant qu'EBF-1 pourrait également être un partenaire potentiel de liaison à l'ADN pour EBNA-2 (Glaser *et al.*, 2017). EBNA-2 active la transcription en recrutant la machinerie transcriptionnelle basale, notamment TFIIB, TAF40, TFIIE et TFIIH (Friberg *et al.*, 2015). L'activation de l'initiation de la transcription par EBNA-2 implique également la liaison aux histones acétyltransférases (HAT) et aux complexes de remodelage de la chromatine tels que SWI/SNF (*SWItch/Sucrose Non-Fermentable*) (Wood *et al.*, 2016).

La protéine EBNA-2 augmente également l'expression du facteur de transcription BATF (*basic leucine zipper transcription factor, ATF-like*), ce qui permet l'inhibition de l'entrée cellulaire dans le cycle lytique par la protéine Zta (Frost and Gewurz, 2018).

Par ailleurs, EBNA-2 est l'une des protéines virales fondamentales à transformer les cellules B naïves *in vitro*. L'incapacité de la souche d'EBV P3HR-1, qui porte une délétion du gène *EBNA-2* et des deux derniers exons de *EBNA-LP*, à transformer les cellules B *in vitro*, a démontré le rôle crucial d'EBNA-2 dans le processus d'immortalisation. La restauration du gène *EBNA-2* dans P3HR-1 a confirmé sans équivoque l'importance de la protéine EBNA-2 dans l'immortalisation des cellules B (Ranger-Rogez, 2021).

EBNA-2 active fréquemment les gènes cellulaires et viraux qui provoquent la prolifération cellulaire. EBNA-2 entraîne l'expression des protéines de latence de l'EBV, LMP-1 et LMP-2 ainsi que le promoteur Cp et conduit à l'induction de l'expression des molécules activatrices membranaires des cellules B comme CD21 et CD23 (X. Wang *et al.*, 2012; Glaser *et al.*, 2017). Il régule également les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*) et active les voies de signalisation en envoyant des signaux de croissance et de différenciation aux cellules B en aval *via* la voie de CD40/récepteur du facteur de nécrose tumorale (Fu, He and Mao, 2013).

EBNA-2 est également connu pour réguler à la hausse le proto-oncogène Myc qui est un facteur de transcription majeur impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires, notamment la progression du cycle cellulaire, la prolifération, la différenciation et la survie. Myc est fréquemment dérégulé dans le cancer, ce qui entraîne une expression aberrante de ses cibles en aval, entraînant une prolifération et une tumorigenèse incontrôlées. EBNA-2 exploite la capacité oncogène de Myc en régulant sa transcription conduisant à une croissance incontrôlée et à une immortalisation cellulaire (Wood *et al.*, 2016).

En 2017, Kim et ses collègues ont montré dans une étude qu'EBNA-2 joue un rôle principal dans la croissance des cellules lymphoblastoïdes et leur survie par la régulation positive des chimiokines CCL3 (*Chemokine Ligand 3*) et CCL4 (*Chemokine Ligand 4*) dans les lymphocytes, conduisant à l'activation des voies Btk (*tyrosine kinase Bruton*) et NF- κ B, et à la résistance à la doxorubicine, qui est utilisée dans le traitement des cellules B de lymphome (J. H. Kim *et al.*, 2017).

C. EBNA-LP « EBNA-Leader Protein »

La protéine EBNA-LP codée par l'ORF *BWRF1*, est la première protéine à être transcrite avec EBNA-2 à partir du promoteur Wp lors de l'infection par l'EBV. Sa partie N-terminale est constituée de répétitions codées par deux exons dérivés de la région IR1, W1 (22 aa) et W2 (44 aa), alors que la région C-terminale est codée par deux exons uniques Y1 et Y2, constitués de 45 acides aminés (Ranger-Rogez, 2021).

EBNA-LP est généralement une phosphoprotéine nucléaire. Néanmoins, elle peut également être retrouvée dans le cytoplasme (Garibal *et al.*, 2007).

EBNA-LP interagit avec EBNA-2, et bien qu'elle ne soit pas nécessaire pour l'immortalisation *in vitro*, elle est indispensable pour la croissance efficace des lignées LCL (Portal *et al.*, 2013; El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018). Les protéines EBNA-2 et EBNA-LP seules peuvent induire la transition de G0 (quiescence) à G1 (entrée dans le cycle de division) en activant la cycline D2 lors de la transfection transitoire de cellules B primaires (Sinclair *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 2016). La coopération d'EBNA-2 et d'EBNA-LP peut également augmenter l'expression de la protéine LMP-1, LMP-2 et le promoteur Cp (Ranger-Rogez, 2021).

Cette co-activation est régulée par la phosphorylation de la protéine EBNA-LP au niveau des résidus sérine S35 et S63 des domaines W1 et W2 par la protéine kinase cellulaire (CDK-1, *Cyclin-dependent kinase 1*) (Yokoyama *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003). Une étude en 1991 a montré le rôle important des exons Y1 et Y2 dans l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Mannick *et al.*, 1991).

La protéine EBNA-LP peut interagir avec p14^{ARF} et MDM2, deux protéines qui empêchent la dégradation de p53 qui arrête le cycle cellulaire et induit l'apoptose. Cette interaction permet la diminution d'expression de la protéine p53 et provoque donc la survie des cellules transformées par l'EBV (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018).

D. EBNA-3

La famille des protéines EBNA-3 se compose de trois membres : EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C, qui sont transcrites à partir du promoteur Cp et codées respectivement par trois gènes du fragment BamHI *BLRF3/BERF1*, *BERF2a/BERF2b* et *BERF3/BERF4*. Les trois membres de la famille ont des structures génétiques similaires, partagent une homologie de séquence partielle et sont disposés en tandem dans le génome de l'EBV (Bhattacharjee *et al.*, 2016; El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018).

En comparant les deux types d'EBV (EBV-1 et EBV-2), les protéines d'EBNA-3A, -3B et -3C contiennent respectivement 944, 938 et 992 aa pour le type 1 et 925, 946 et 1069 aa pour le type 2, ce qui rend ces protéines responsables, comme EBNA-2, du polymorphisme de l'EBV (Robertson *et al.*, 1995; Robertson, Lin and Kieff, 1996).

Comme EBNA-2, EBNA-3A, -3B et -3C agissent comme des facteurs de transcription et entraînent la prolifération et la transformation des cellules B par reprogrammation épigénétique (Wood *et al.*, 2016). Des études utilisant l'EBV recombinant ont montré que EBNA-3A et -3C sont essentiels pour une transformation et une immortalisation efficaces des lymphocytes B *in vitro*, alors qu'EBNA-3B n'est pas nécessaire (Bhattacharjee *et al.*, 2016).

Les protéines EBNA-3 ne peuvent pas se lier directement à l'ADN. Elles forment, comme EBNA-2, des complexes avec des protéines cellulaires de liaison à l'ADN telles que RBP-Jk, permettant l'accès aux éléments régulateurs des gènes. Les protéines de la famille EBNA-3, en bloquant l'interaction EBNA-2/RBP-Jk, peuvent réguler négativement l'activation des gènes induite par EBNA-2. Étant donné que les protéines EBNA-3 peuvent inhiber l'activation des promoteurs viraux Cp et le promoteur de LMP-2A induite par EBNA-2, cela suggère que les protéines EBNA-3 peuvent former une boucle de rétroaction négative qui restreint l'expression de tous les gènes activés par EBNA2/RBP-Jk, y compris leur propre expression (Allday *et al.*, 2015).

Les protéines EBNA-3 ont surtout été étudiées comme des répresseurs transcriptionnels. Elles peuvent réguler individuellement ou ensemble les gènes qui contrôlent la croissance et la survie par le biais du silence épigénétique médié par de multiples combinaisons (Hertle *et al.*, 2009; White *et al.*, 2010; McClellan *et al.*, 2012; Paschos *et al.*, 2012, 2019). Un exemple de reprogrammation du génome cellulaire par EBNA-3A est l'inhibition des gènes de chimiokines CXCL10 et CXCL9, qui avec leurs récepteurs dans les cellules NK et T sont essentiels pour contrôler l'infection virale. EBNA-3A est capable de réduire CXCL10 et CXCL9 en se liant à des éléments activateurs intragéniques situés entre ces gènes et en remplaçant EBNA-2, ce qui altère l'activité activatrice et conduit au dépôt de H3K27me3 (*Histone H3 lysine 27 Tri-methylation*) médié par de multiples combinaisons. L'inhibition de CXCL10 et CXCL9 par la protéine EBNA-3A peut contribuer à l'évasion de la surveillance immunitaire (McClellan *et al.*, 2012; Harth-Hertle *et al.*, 2013).

EBNA-3A et EBNA-3C peuvent également fonctionner en coopération et jouent un rôle inhibiteur contre la protéine BCL2L11 (*Bcl-2-like protein 11*), conduisant à la prolifération incontrôlée des cellules B et à la lymphomagenèse (Fu, He and Mao, 2013; Bhattacharjee *et al.*, 2016). BCL2L11, également connue sous le nom de BIM, appartient à la famille des protéines Bcl-2 et est codée par le gène BCL2L11. C'est une protéine pro-apoptotique et un régulateur important des voies apoptotiques, qui est fortement exprimée dans les cellules hématopoïétiques et s'est avéré essentiel pour l'apoptose au cours du développement des cellules B. Dans les cellules B normales, l'expression de BCL2L11 est étroitement régulée et sa transcription peut être activée par différents facteurs de transcription, notamment Myc et Smad1/3 (Sionov, Vlahopoulos and Granot, 2015). La famille de protéines EBNA-3 est capable de diminuer l'expression de BCL2L11, pour empêcher l'apoptose déclenchée par la surexpression de Myc induite par EBNA-2 (McClellan *et al.*, 2012; Fu, He and Mao, 2013).

EBNA-3A et -3C sont également responsables de l'arrêt de la transcription des inhibiteurs de la kinase cycline-dépendante p16^{INK4A} et p14^{ARF}, des régulateurs puissants du cycle cellulaire et des suppresseurs de tumeurs codés par le gène CDKN2A. L'inhibition de l'expression de CDKN2A par EBNA-3A et -3C, avec le co-suppresseur cellulaire CtBP, favorise la transformation

et la croissance des cellules B, ainsi que l'entrée du cycle cellulaire pour la réplication virale en surmontant le blocage de la prolifération entraîné par p16^{INK4a} et p14^{ARF} (Skalska *et al.*, 2010, 2013; Maruo *et al.*, 2011; Tursiella *et al.*, 2014). EBNA-3A et EBNA-3C recrutent le complexe répresseur de Sin3A (Sin3A, HDAC1 et 2 et RBP-Jk) sur les sites régulateurs de CDKN2A pour éliminer les marques d'acétylation des histones et recruter le complexe répresseur médié par de multiples combinaisons menant au dépôt de H3K27Me3 (Skalska *et al.*, 2013; Bhattacharjee *et al.*, 2016) (**Figure 10**).

Par ailleurs, EBNA-3C inhibe la dégradation de la protéine MDM2, entraînant ainsi la diminution de la protéine p53 et favorisant la prolifération cellulaire (Bhattacharjee *et al.*, 2016).

Contrairement à EBNA-3A et EBNA-3C, EBNA-3B n'est pas nécessaire pour la transformation des lymphocytes B *in vitro*. EBNA-3B a été identifié comme un suppresseur de tumeur qui exerce des effets suppresseurs de croissance en régulant à la hausse la chimiokine CXCL10. Des études ont montré que des souris NOD/SCID/IL2 γ ^{null} portant des composants immunitaires humains recombinants infectés par l'EBV, dans lequel EBNA-3B est déplété, développent des lymphomes diffus à grandes cellules B, tandis que les souris infectées par l'EBV de type sauvage (*wild-type EBV*) ont développé des tumeurs à cellules B moins agressives. L'incapacité à exprimer EBNA-3B a entraîné une prolifération plus rapide des lymphocytes B et une diminution de la sécrétion de la chimiokine des lymphocytes T CXCL10, entraînant un recrutement inefficace des lymphocytes T *in vitro* et une élimination réduite des lymphocytes T *in vivo* (White *et al.*, 2012). Des profils d'expression génique et des caractéristiques phénotypiques similaires ont été trouvés dans quelques lignées de cellules B dérivées de lymphomes humains qui codent pour une version tronquée d'EBNA-3B (Gottschalk *et al.*, 2001). On pense que le rôle d'EBNA-3B *in vivo* pourrait être de déclencher la transition de la latence III à la latence II lors de la réponse du centre germinale aux gènes répresseurs tels que CXCL1, IL10 et IL19 qui interviennent dans les interactions essentielles des lymphocytes T dans l'environnement germinale et dans la différenciation des lymphocytes B (White *et al.*, 2010, 2012).

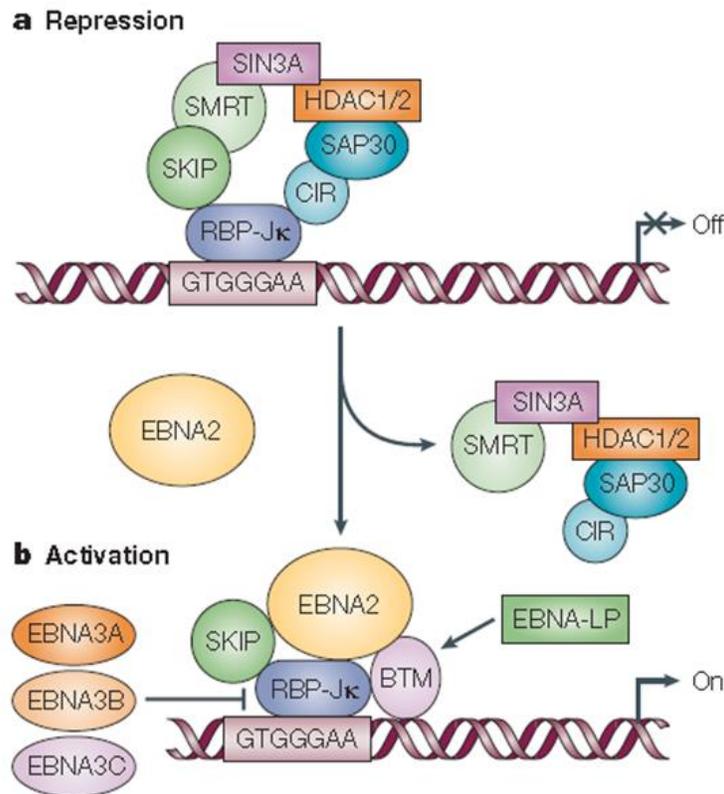


Figure 10. Schéma représentant les fonctions de protéines EBNA.

a | L'antigène nucléaire 2 codé par l'EBV (EBNA-2) agit comme un activateur transcriptionnel en interagissant avec la protéine de liaison à l'ADN RBP-Jκ (recombinant binding protein JKappa) et en diminuant la répression transcriptionnelle médiée par un grand complexe multiprotéique composé de SMAT, SIN3A, HDAC1 (histone deacetylase 1) et HDAC2. SKIP (Ski interacting protein) est une autre protéine interagissant avec RBP-Jκ qui interagit également avec le complexe corépresseur SMRT-HDAC. EBNA-2 bloque la répression médiée par RBP-Jκ en se liant à RBP-Jκ et SKIP, en concurrence avec le complexe corépresseur SMRT-HDAC.

b | Le domaine acide d'EBNA-2 recrute ensuite la machinerie transcriptionnelle basale (TFIIB, TFIID et p300 ; non illustré) pour activer la transcription. EBNA-LP coopère avec EBNA2 dans l'activation transcriptionnelle médiée par RBP-Jκ en interagissant avec le domaine d'activation acide d'EBNA-2. La famille de protéines EBNA-3 régule l'activation de RBP-Jκ par EBNA-2 en interagissant avec RBP-Jκ et en compétition pour la liaison et l'activation d'EBNA-2. L'homologue RBP-Jκ de la drosophile est impliqué dans la signalisation du récepteur Notch, une voie importante dans la détermination du devenir cellulaire de la drosophile et a également été impliquée dans le développement de tumeurs de cellules T humaines. EBNA2 peut remplacer fonctionnellement le domaine intracellulaire de Notch. BTM : basal transcription machinery – CIR : CBF1 (RBP-Jκ)-interacting corepressor - SAP30 : SIN3-associated protein 30. D'après (Young and Rickinson, 2004).

IV.2.2.2. Les protéines membranaires de latence (LMP)

A. LMP-1

La protéine LMP-1, codée par l'ORF *BNLF1*, est transcrite dans la direction L (de U5 vers U1) (Banko *et al.*, 2012). LMP-1 est une protéine transmembranaire composée de 386 acides aminés, consistant en une région N-terminale intra-cytoplasmique (24 aa), six régions transmembranaires, chacune de 20 aa, organisées en hélice α et reliées entre elles par des boucles de 8 à 10 aa et une queue C-terminale intra-cytoplasmique (200 aa), composée de trois composants appelés CTAR (*Carboxy-Terminal Activating Regions*)¹ (aa 187-231), CTAR2 (aa 352-386) et CTAR3 (aa 232–350) (Ranger-Rogez, 2021) (**Figure 11**).

La protéine LMP-1 est considérée comme une oncoprotéine fondamentale du virus de l'EBV. Elle a un rôle majeur dans l'immortalisation et la transformation des lymphocytes B par l'EBV *in vitro* (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018). Une étude en 1985 a pu révéler la possibilité des cellules exprimant LMP-1 à induire la formation de tumeurs après injection à des souris nues (Wang, Liebowitz and Kieff, 1985).

La fonction de LMP-1 est associée au moins à quatre voies de signalisation, dont NF- κ B, JNK/AP1 (*c-Jun amino-terminal Kinase/activator protein-1*), p38/MAPK (*p38 Mitogen Activated Protein Kinase*) et JAK/STAT (*Janus Activated Kinase/ signal transducer and activator of transcription proteins*). L'activation de ces voies conduit à l'induction de diverses protéines et cytokines anti-apoptotiques (Saha and Robertson, 2019). CTAR1 est situé près de la membrane et est essentiel pour la transformation des cellules B, tandis que CTAR2 à l'extrémité C-terminale est nécessaire pour la croissance à long terme des cellules B infectées par l'EBV. Dans une réponse immunitaire normale, les cellules T utilisent leur ligand de surface de CD40 pour activer la signalisation de CD40 dans les cellules B. A la surface des cellules B infectées, LMP-1 imite le récepteur de CD40 qui fait partie de la superfamille des récepteurs du facteur de nécrose tumorale (TNFR, *tumour necrosis factor receptor*). LMP-1 agit comme un CD40 constitutivement activé (Kieser and Sterz, 2015). L'activation de NF- κ B par LMP-1 se produit par interaction de CTAR1 et CTAR2 avec les protéines TRAF (*TNF-receptor associated factor*) et TRADD (*TNF Receptor Associated Death Domain*), respectivement (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018; Maria K. Smatti *et al.*, 2018). L'activation du facteur de transcription NF- κ B conduit à l'expression du gène anti-apoptotique Bcl2, par exemple (Kieser and Sterz, 2015). L'activation de la cascade de signalisation JNK se produit dans la région CTAR2, et l'activation de p38/MAPK et JAK/STAT se produit dans les régions CTAR1 et 2. La troisième région CTAR3, entre CTAR1 et CTAR2, n'est pas essentielle à l'immortalisation des cellules B *in vitro* et est moins connue. Elle active la voie de signalisation JAK3/STAT qui peut stimuler la transcription et l'expression de VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), favorisant ainsi l'invasion et les métastases des cellules NPC (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018).

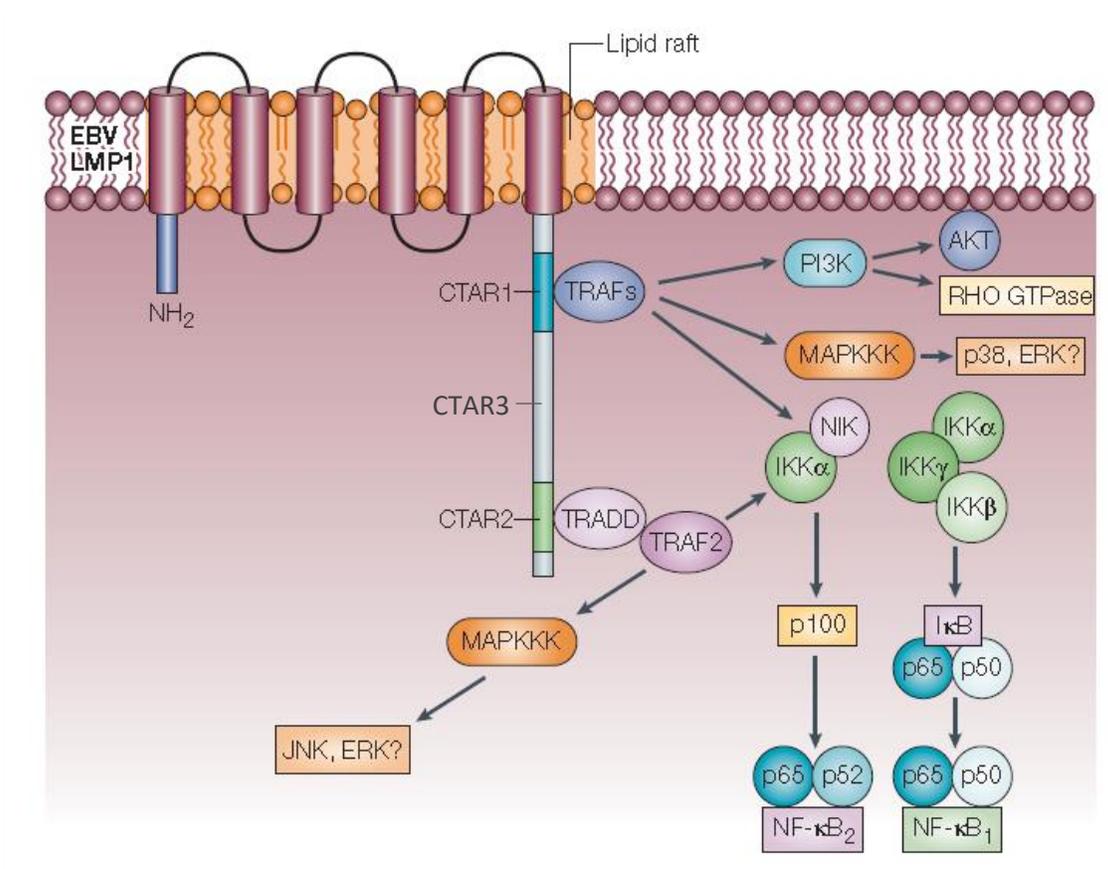


Figure 11. Schéma représentant la structure et la fonction de LMP-1.

La protéine membranaire latente 1 (LMP-1) de l'EBV peut être subdivisée en trois domaines : (1) une queue cytoplasmique N-terminale (aa 1–23), qui attache la LMP-1 à la membrane plasmique et oriente la protéine (2) six boucles transmembranaires hydrophobes, qui sont impliquées dans l'auto-agrégation et l'oligomérisation (aa 24–186) (3) une longue région cytoplasmique C-terminale (aa 187–386), qui possède la majeure partie de l'activité de signalisation de la molécule. Deux régions fonctionnelles distinctes, appelées régions d'activation C-terminales 1 et 2 (CTAR1 et CTAR2), ont été reconnues pour activer la voie de NF- κ B. Les facteurs TRAF, associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), interagissent soit directement avec CTAR1, soit indirectement par l'intermédiaire de la protéine TRADD, qui se lie à CTAR2. Ces protéines adaptatrices recrutent ensuite un complexe multiprotéique contenant NIK (*NF- κ B-inducing kinase*) et IKK (*I κ B kinases*). Celui-ci entraîne l'activation de la voie NF- κ B classique I κ B α -dépendante (impliquant les hétérodimères p50-p65) et la transformation de p100 NF- κ B2 pour générer les hétérodimères p52-p65. LMP-1 recrute d'autres kinases *via* l'interaction avec les molécules TRAF, notamment MAPKK (*mitogen-activated protein kinase kinase kinases*), TPL2 et TAK1 qui contribuent à l'activation des voies NF- κ B, MAPK et PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*). ERK, *extracellular signal-regulated kinase*, JNK, *c-JUN amino-terminal kinase*. Modifié d'après (Young and Rickinson, 2004).

L'expression de la protéine LMP-1 stimule ces diverses voies cellulaires qui sont à la base de toutes les conséquences phénotypiques. Dans les cellules B infectées par l'EBV, par exemple, l'expression de LMP-1 provoque une agrégation des lymphocytes B, une expression accrue des facteurs d'activation des lymphocytes B (CD21, CD23, CD30, CD39, CD40 et CD44, CD80, CD83), des molécules d'adhésion immuno-activatrices (ICAM-1 (*InterCellular Adhesion*

Molécule), LFA-1 et -3 (*Lymphocyte Function Associated Antigen*)), des antigènes du CMH-I, des ligands de la transferrine, la vimentine, et l'interleukine 10 (IL10) (Maria K. Smatti *et al.*, 2018).

Elle augmente également l'expression des chimiokines CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, IP10 (*Interferon-Inducible Protein 10*), qui recrutent les lymphocytes T et NK pour éliminer les cellules infectées. Mais LMP-1 peut aussi aider à éviter le système immunitaire en contrôlant l'expression de CCL17 et CCL22 (Tsai *et al.*, 2013).

Récemment, Morris et ses collègues ont été prouvé que la protéine LMP-1 agit comme une molécule régulatrice de l'adhésion cellulaire en modulant la signalisation de l'activine-A/TGF- β et de l'intégrine β 1 (Morris *et al.*, 2016).

Par ailleurs, l'équipe de He a identifié une nouvelle caractéristique relative à l'oncogénicité de LMP-1 : l'expression de la protéine TAZ (appelée aussi WWTR1 (*WW domain containing transcription regulator 1*)), une protéine essentielle à la prolifération cellulaire et à la transition épithélio-mésenchymateuse, serait régulée positivement par LMP-1 (He *et al.*, 2017).

B. LMP-2

Le gène *LMP-2* présente un épissage alternatif qui code pour deux protéines différentes : LMP-2A et LMP-2B (Cen and Longnecker, 2015). La transcription de LMP-2A est déclenchée au niveau des régions répétitives terminales (TR) car le gène est situé sur les deux extrémités du génome de l'EBV. Pour cela, La transcription du gène *LMP-2A* ne peut avoir lieu que lorsque le génome est sous forme circulaire (Fox *et al.*, 2010; Wasil *et al.*, 2013).

Les protéines LMP-2 sont constituées d'un domaine cytoplasmique N-terminal de 119 aa qui est absent de la protéine LMP-2B, douze domaines transmembranaires qui permettent de localiser LMP-2 dans les membranes cellulaires, et un domaine C-terminal de 27 aa qui intervient dans la dimérisation des isotypes de LMP-2 (Cen and Longnecker, 2015) (**Figure 12**).

Ces protéines sont exprimées dans de nombreuses tumeurs malignes associées à l'EBV, où elles sont colocalisées avec la protéine LMP-1, avec laquelle elles peuvent interagir. Les protéines LMP-2 ne sont pas essentielles à l'immortalisation des cellules B *in vitro*. Cependant, l'expression de LMP-2A chez des patients atteints de HL, par exemple, empêche le développement normal des cellules B en favorisant l'accumulation de cellules B négatives en immunoglobulines dans les organes lymphoïdes périphériques, ce qui indique que LMP-2A joue un rôle dans la prolifération et la survie des cellules B en l'absence d'un BCR (*B-Cell Receptor*) fonctionnel (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018).

Le domaine N-terminal de la protéine LMP-2A contient huit résidus tyrosine qui forment ensemble un motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*). Comme les motifs ITAM présents dans CD79A et CD79B, composants du BCR, le motif ITAM de LMP-2A interagit avec et est phosphorylé par les protéines tyrosine kinases (PTK, *protein tyrosine kinases*), LYN et SYK. Dans les cellules B matures normales, la phosphorylation du motif ITAM de CD79A et CD79B active une cascade de signalisation conduisant à la prolifération et à la différenciation des cellules B. Cependant, l'interaction de LYN et SYK avec le motif ITAM de LMP-2A semble réguler

négativement leur activité. L'effet négatif de LMP-2A sur l'activité de LYN et SYK entraîne une réduction de la libération de Ca^{2+} induite par le BCR, de la phosphorylation de la tyrosine et de l'activation du cycle lytique de l'EBV dans les cellules B. Cela suggère que LMP-2A peut jouer un rôle important dans le maintien de la latence de l'EBV (Wasil *et al.*, 2013; El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018; Saha and Robertson, 2019; Borna *et al.*, 2020).

LMP-2A imite le récepteur BCR et transmet un signal de survie aux cellules B, leur permettant d'échapper à l'apoptose sans être sélectionnées *in vivo* dans le centre germinatif (El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018). En effet, LMP-2A stimule de façon constitutive les deux voies PI3K/Akt et PI3K/Ras impliquées dans la survie cellulaire. La voie de signalisation PI3K/Akt empêche l'apoptose due au TGF- β (*Transforming Growth Factor of B cells*) et conduit à l'expression de l'IL10 (Fukuda and Longnecker, 2007; Incrocci, McCormack and Swanson-Mungerson, 2013; El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018).

Quant à la protéine LMP-2B, les études sont moins nombreuses. Elle peut réguler l'agrégation de LMP-2A et contrôler négativement sa fonction pour empêcher la transition cycle latent - cycle lytique (Saha and Robertson, 2019).

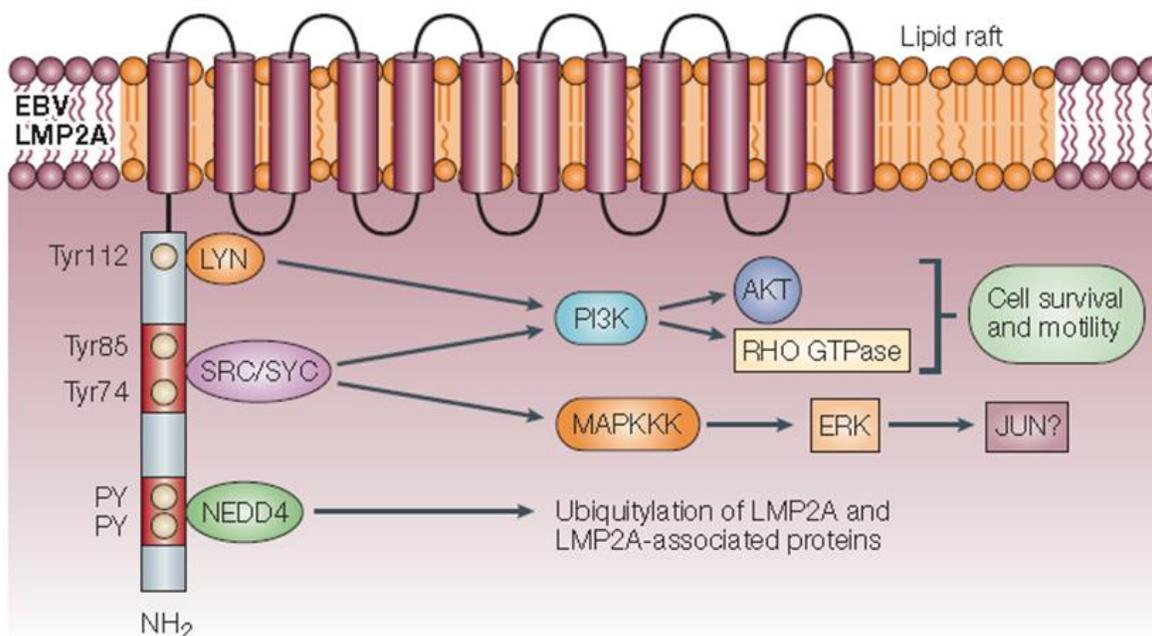


Figure 12. Schéma représentant la structure et la fonction de LMP-2.

Les protéines membranaires latentes LMP-2A et LMP-2B sont structurellement similaires ; elles ont toutes deux 12 domaines transmembranaires avec une terminaison carboxyle cytoplasmique à 27 acides aminés. De plus, LMP-2A possède un domaine N-terminal cytoplasmique de 119 acides aminés contenant huit résidus tyrosine, dont deux (Tyr74 et Tyr85) forment un motif ITAM. L'ITAM phosphorylé recrute des protéines tyrosine kinases, membres de la famille SRC, et de la tyrosine kinase SYK et régule négativement leur activité. Le résidu tyrosine proximal de la membrane, Tyr112, se lie à la tyrosine kinase LYN et médie la phosphorylation constitutive d'autres résidus tyrosine dans les LMP-2A. ITAM de LMP-2A bloque la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) en séquestrant ces tyrosine kinases et en empêchant la translocation de BCR dans les radeaux lipidiques. LMP-2A recrute également une protéine ligase ubiquitine

de type NEDD4 *via* un motif phosphotyrosine (PY), favorisant la dégradation de LYN et LMP-2A par un mécanisme dépendant de l'ubiquitine. LMP-2A interagit avec ERK1 et MAPK, ce qui conduit à la phosphorylation de deux résidus sérine (Ser15 et Ser102) de LMP-2A et peut contribuer à l'activation de JUN induite par LMP-2A. ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activation motif - ERK1 : extracellular signal-regulated kinase 1 - MAPK : mitogen-activated protein kinase – MAPKKK : MAPK kinase kinase - PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase. D'après (Young and Rickinson, 2004).

IV.2.2.2.3. Les ARN et miARN viraux de latence

A. BART (*BamHI-A Rightward Transcripts*)

Les BART sont des ARN qui constituent un ensemble d'ARN épissés de manière hétérogène, dont la taille varie de 4 à 8 kpb. Cet épissage alternatif et complexe entraîne la transcription de plusieurs ORF, composés de BARF0, A73, et RPMS1 (Verhoeven *et al.*, 2019).

Les ARN BART ont d'abord été détectés dans des xénogreffes de NPC ainsi que dans des biopsies de NPC (Hitt *et al.*, 1989; Gilligan *et al.*, 1991). Ils ont ensuite été identifiés dans d'autres tumeurs associées à l'EBV, comme le carcinome gastrique, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, le lymphome T/NK, mais également dans les lymphocytes B du sang périphérique de personnes saines, infectés par l'EBV (Strong *et al.*, 2013). Chakravorty suggère que les BART sont probablement présents dans toutes les formes de tumeur (Chakravorty *et al.*, 2019).

Les BART ont été caractérisés comme étant exprimés dans toutes les phases de latence, bien que de manière prédominante pendant les latences de types I ou II, ainsi que durant le cycle lytique (Marquitz and Raab-Traub, 2012).

Bien que les protéines putatives codées par les BART présentent des caractéristiques qui pourraient être importantes pour la transformation cellulaire, elles n'ont jamais été observées *in vivo* (Hitt *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2000; Al-Mozaini *et al.*, 2009).

Ces ARN persistants ont été signalés dans le noyau, et il a été supposé qu'ils agissent comme de longs ARN non codants (lncRNA, *long non-coding RNAs*) qui contrôlent sélectivement la production de gènes cellulaires et viraux (Verhoeven *et al.*, 2019). Les BART codent aussi des micro-ARN (miARN) introniques matures, dont la plupart sont exprimés à un taux relativement important dans les mêmes tumeurs que celles qui produisent les BART. Ces miARN favorisent principalement le développement et la propagation des tumeurs en assurant le maintien de la latence par le blocage des transcrits lytiques, ainsi qu'en bloquant les défenses immunitaires (Cai *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009; Marquitz *et al.*, 2015; Li, Jheng and Chen, 2018).

B. EBER

Les EBER, découverts pour la première fois en 1981, sont de petits ARN non codants et non polyadénylés composés de deux types, EBER-1 et EBER-2. Ces EBER représentent l'ARN

viral le plus abondant dans les cellules infectées pendant toutes les phases de latence (III, II, I, 0). Ils sont constitués de nucléotides courts, respectivement 167 et 172 nt. De manière intéressante, ils sont transcrits par l'ARN polymérase III de l'hôte au niveau de la région BamHI-C du génome viral pendant l'infection latente. (Rosa *et al.*, 1981; Glickman, Howe and Steitz, 1988; Ahmed, Tariq and Khan, 2018).

Les ARN EBER jouent le rôle de régulateurs de la signalisation et de moteurs de transcription, permettant de produire des interférons et des cytokines (Samanta, Iwakiri and Takada, 2008; Iwakiri, 2014).

De nombreuses fonctions des EBER ne sont toujours pas connues, mais on sait qu'ils peuvent se fixer à PKR (*Protein kinase RNA-activated*), qui fonctionne en synergie avec les interférons, ce qui suggère un mécanisme par lequel les EBER peuvent améliorer la résistance virale à l'immunité innée (Fu, He and Mao, 2013; Iwakiri, 2014).

De plus, Kitagawa a démontré que les EBER peuvent induire la production d'une cytokine immunosuppressive « IL-10 » dans le BL (Kitagawa, 2000; Iwakiri, 2014).

En outre, ces ARN induisent l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2, ce qui participe à la malignité et au maintien de la croissance cellulaire dans le lymphome de Burkitt (Fu, He and Mao, 2013).

L'expression des EBER peut déclencher un cancer chez les souris présentant un déficit immunitaire combiné sévère (SCID, *Severe combined immunodeficiency*) (Komano *et al.*, 1999; Yamamoto *et al.*, 2000).

Plus précisément, les EBER peuvent se lier à des protéines cellulaires et former des complexes ARN-protéines. Par exemple, EBER-1 peuvent se combiner avec la protéine ribosomale humaine L22 (RPL22, *ribosomal protein L22*). RPL22 se lie à l'ARNm de p53, réduisant ainsi sa traduction. Mais, EBER1 ne semble pas affecter l'expression de p53 dans les LCL (Gregorovic *et al.*, 2015). En outre, ces ARN peuvent aussi se combiner avec l'autoantigène La (*lupus antigen*), provoquant leur passage du nucléole au nucléoplasme et le transport des EBER dans les exosomes sous la forme d'un complexe ARN-protéine (complexe EBER-La) (Ahmed *et al.*, 2014).

C. miARN

L'EBV a été le premier virus humain pour lequel il a été montré qu'il exprimait des miARN (microARN). Durant ces dernières années, les chercheurs se sont de plus en plus intéressés à la présence de miARN dans l'infection par l'EBV, ces miARN semblant jouer un rôle dans la transcription des génomes cellulaires et viraux (Navari *et al.*, 2018).

Les miARN sont des séquences d'ARN simple brin endogènes hautement conservées de longueur comprise entre 19 et 25 nucléotides (Albanese *et al.*, 2016). Pour l'EBV, ils sont composés de 49 micro-ARN issus de 25 précurseurs (pré-mi-ARN) (Skalsky, 2017).

Les miARN de l'EBV sont transcrits à partir de deux clusters, BART et BHRF1 (Bam HI Fragment H Rightward open Reading frame 1), ce dernier codant trois pré-mi-ARN alors que les autres sont produits à partir du cluster BART (Kim and Lee, 2012).

Les miRNA viraux sont transcrits pendant toutes les phases de latence. Il a été observé que l'expression de miBART et de miBHRF1 varie selon le type de latence virale et de cellule. En effet, les miBART sont largement exprimés dans la phase de latence I et II alors qu'ils sont peu ou non détectables dans la latence III. En revanche, les miBHRF1 ont été trouvés dans les cellules de latence III (Kang and Kieff, 2015; Navari *et al.*, 2018).

De manière appropriée, les miARN sont susceptibles de jouer un rôle essentiel dans la transformation, le maintien de la phase de latence, ainsi que dans l'évasion immunitaire et le blocage des réponses aux interférons en agissant sur des cibles cellulaires et virales diverses (Pfeffer *et al.*, 2004; Lo *et al.*, 2007; Feederle *et al.*, 2011; Forte and Luftig, 2011; Kuzembayeva, Hayes and Sugden, 2014; Marquitz *et al.*, 2015; Albanese *et al.*, 2016). Par exemple, l'inactivation de tous les miBHRF1 ou de certains d'entre eux limite la croissance des LCL *in vitro* (Skinner *et al.*, 2017). Le miR-BHRF1-3 de l'EBV cible CXCL11, un chimioattractant pour les cellules T activées (Xia *et al.*, 2008). Par ailleurs, l'expression de miR-BART20 ou miR-BART8 de l'EBV régule à la baisse l'activité de la luciférase issue de l'interféron gamma (IFN- γ) (Lin *et al.*, 2013).

IV.2.3. La réactivation

Dans certaines conditions, le virus de l'EBV, présent sous forme latente dans les cellules B mémoires, peut réactiver et entrer dans le cycle lytique dans lequel les gènes lytiques sont de nouveau activés. Cette transition se fait à l'aide du transactivateur protéique ZEBRA dont l'expression est suffisante pour activer le cycle lytique (Münz, 2019).

La réactivation lytique de l'EBV conduit normalement à un cycle lytique complet dans lequel tous les gènes lytiques (très précoces, précoces et tardifs) sont activés. Ce cycle lytique complet contribue à la production de nouvelles particules virales disséminant dans la salive, ce qui provoque l'infection des cellules épithéliales et donc l'éventuelle transmission virale à un nouvel hôte ou bien l'infection de cellules B dans le même hôte et donc la prolifération cellulaire de ces cellules.

La réactivation de l'EBV peut conduire encore à un cycle lytique incomplet appelé « cycle lytique abortif » où un ou plusieurs gènes lytiques précoces de l'EBV sont exprimés en l'absence des protéines structurales tardives et donc sans production de virions. Ce cycle abortif joue un rôle dans la régulation des voies oncogéniques des cellules B (Rosemarie and Sugden, 2020). Dans ce cycle abortif, plusieurs gènes lytiques sont exprimés, tels que les anti-apoptotiques (BHRF1 et BALF1) (Drouet, 2020). Ces deux protéines sont des homologues de Bcl2 cellulaire et, à ce titre, il a été démontré que BHRF1 inhibe l'activité des protéines pro-apoptotiques Bax (*Bcl-2-associated X protein*) et Bak (*BCL2 Antagonist/Killer*) (Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018). De même, les protéines immunomodulatrices (BCRF1, BARF1, BILF1, BGLF5, BNLF2a, BLLF3 et BPLF1) sont aussi exprimées (Drouet, 2020). BARF1 réagit avec le ligand du

récepteur, le M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), et altère l'activité phagocytaire et oxydative des macrophages dépendant du M-CSF. Par conséquent, BCRF1 fonctionne comme un antagoniste de M-CSF interférant avec la différenciation et l'activation des monocytes. En plus, cette protéine régule à la hausse la protéine anti-apoptotique Bcl-2, la télomérase et la cycline D1. BCRF1 code pour la protéine vIL-10, une homologue virale d'IL-10 cellulaire. vIL-10 est souvent co-exprimée avec BZLF1 pendant l'expression lytique abortive, et dans les échantillons primaires isolés de carcinomes EBV positifs, et dans les lymphomes à cellules B, T et NK. Elle protège les cellules B infectées contre l'élimination par les cellules NK, peut bloquer les réponses des cellules CD4+ et la production de cytokines inflammatoires, et favorise ultérieurement la prolifération et la différenciation des cellules B. BNLF2a empêche la liaison du TAP au peptide et à l'ATP, inhibant ainsi le chargement du peptide sur les molécules HLA de classe I et la présentation de l'antigène aux lymphocytes T cytotoxiques. Un niveau très élevé d'expression de BNLF2a permet en effet de protéger la cellule tumorale infectée contre les défenses immunitaires. Les autres, BILF1 et BGLF5, sont deux protéines lytiques qui dérégulent également la voie de traitement des antigènes par l'hôte pour échapper à l'élimination des cellules infectées par l'EBV et contribue donc à l'évasion immunitaire de l'EBV (Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018).

Au niveau oro-pharyngé, l'EBV infecte donc les lymphocytes B naïfs infiltrants et entraîne la propagation de l'infection dans les amygdales. Au début, le virus évite la réponse immunitaire en établissant une latence à l'intérieur des cellules B mémoire infectées. En cas de stimuli physiologiques, ces cellules B peuvent se différencier en plasmocytes dans lesquels le virus peut réactiver, se répliquer spontanément et libérer des virions ce qui favorise l'infection de nouvelles cellules B et de cellules épithéliales. Les cellules B constituent donc un important réservoir de l'EBV (Münz, 2019).

Les études sur la réactivation *in vitro* sont souvent réalisées sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes ou des lignées dérivées de lymphomes. Des stimuli physiologiques ou des agents chimiques, tels que la stimulation antigénique des BCR, l'immunodéficience, le TGF- β , les agonistes de la protéine kinase C (PKC), les inhibiteurs de la méthyltransférase de l'ADN, les inhibiteurs des histone déacétylases, etc... peuvent déclencher cette transition. Cette transition cycle latent – cycle lytique est plus ou moins intense, dépendante des stimuli et des lignées utilisées. Des effets synergiques de ces stimuli peuvent être utilisés (Mckenzie and El-Guindy, 2015).

V. Physiopathologie de l'infection par l'EBV

L'infection par l'EBV se produit généralement par la transmission de particules virales par la salive. La primo-infection par l'EBV est établie dans le tissu oro-pharyngé (**Figure 13**). Au début, l'EBV infecte principalement les cellules épithéliales (Tangye, Palendira and Edwards, 2017). Après l'entrée du virus dans la cellule, la nucléocapside virale est dégradée et le génome de l'EBV arrive dans le noyau où la réplication de l'ADN est effectuée par l'ADN polymérase virale. Durant cette infection, l'EBV est en cycle lytique, cycle dans lequel tous les gènes lytiques

sont exprimés pour produire de nouveaux virions et transmettre l'infection (Kenney and Mertz, 2014). Au niveau de l'oro-pharynx, le virus infecte aussi les cellules B naïves résidant dans les tissus lymphoïdes sous l'épithélium des amygdales. Dans ces cellules, le virus va exprimer tous les gènes associés à la latence de l'EBV (latence de type III) ce qui déclenche la prolifération des cellules B. Une réponse immunitaire va se développer, entraînant une élimination des lymphocytes B infectés par des lymphocytes T spécifiques à l'EBV, ainsi que par l'activation des cellules NK chez les hôtes immunocompétents. En régulant à la baisse ses protéines immunogènes, le virus est capable de survivre dans l'hôte. Pour cela, alors que les lymphocytes B infectés pénètrent dans les ganglions lymphatiques, où ils peuvent proliférer, le virus n'exprime plus que trois protéines virales (latence de type II). Lorsque les lymphocytes B infectés émergent des ganglions lymphatiques et migrent vers le sang périphérique sous forme de lymphocytes B mémoire au repos, toutes les protéines virales sont régulées à la baisse (latence de type 0), ce qui rend le virus indétectable par le système immunitaire. Pendant la prolifération homéostatique, lorsque les lymphocytes B infectés se divisent, le virus exprime la protéine EBNA-1 (latence de type I) permettant la réplication et la maintenance de l'épisome viral durant la division cellulaire (Tashiro and Brenner, 2017; Münz, 2019). Lors de la stimulation par l'antigène des BCR ou le TGF- β , ces cellules B mémoire infectées de manière latente se différencient en plasmocytes et l'EBV présent reprend un cycle lytique. La réplication virale est déclenchée et la migration cellulaire vers l'épithélium amygdalien permet la transmission de l'EBV *via* des particules virales sécrétées dans la salive (Tangye, Palendira and Edwards, 2017; Münz, 2019).

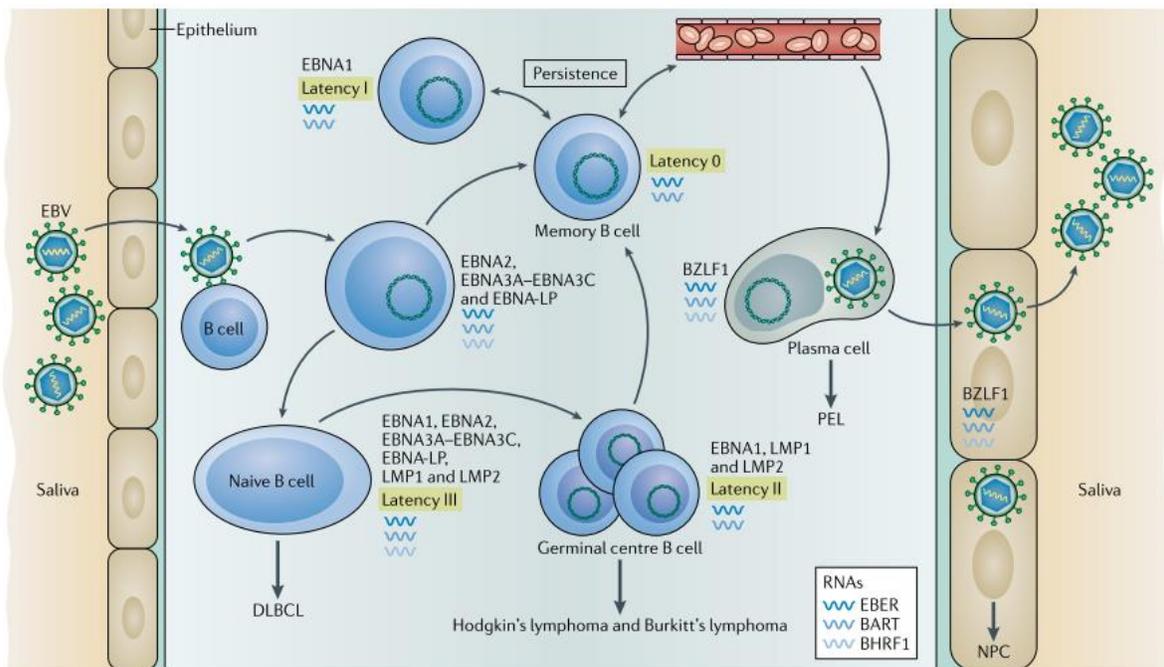


Figure 13. Cycle d'infection par l'EBV : entre la primo-infection et l'établissement de la persistance.

Epstein-Barr Nuclear Antigens (EBNA-LP; -1; -2; -3A; -3B et -3C) ; LMP : Latence Membrane Proteins (LMP-1; -2A et -2B) ; EBER : EBV Encoded RNA (EBER-1 et -2) ; BART : Bam HI-A region rightward transcript ; BHRF1 : Bam HI fragment H rightward open Reading frame I ; BZLF1 : gène lytique exprimant la protéine ZEBRA ; DLBCL : Diffuse large B cell lymphoma ; NPC : Nasopharyngeal Carcinoma ; PEL : plasmacytoma primary effusion lymphoma. D'après (Münz, 2019).

VI. Pathologies associées à l'EBV

L'EBV a été le premier virus humain découvert associé à des cancers (Dunmire, Verghese and Jr, 2018). Depuis sa découverte dans les années 1960, une pléthore de recherches a révélé que l'EBV était étiologiquement lié à un certain nombre de tumeurs malignes humaines. Ceux-ci incluent le lymphome de Burkitt, BL, certains lymphomes de Hodgkin, HL, certains lymphomes non-hodgkiniens post-transplantation (PTLD, *Post-Transplant Lymphoproliferative Disease*), le lymphome à cellules NK/T, le carcinome du naso-pharynx NPC et une proportion de carcinomes gastriques, GC. L'association au virus peut être trouvée aussi bien chez des individus immunocompétents ou chez des sujets immunodéficients. La détection fréquente de l'EBV dans ces types de tumeurs prouve que le virus contribue à l'oncogenèse (Farrell, 2019). Chaque année, le virus de l'EBV est associé à environ 200 000 nouveaux cas de tumeurs dans le monde entier (Fugl and Andersen, 2019).

VI.1. Lymphomes liés à l'EBV

VI.1.1. Lymphome de Burkitt (BL)

Le lymphome de Burkitt (BL) est un lymphome non-hodgkinien à cellules B, très agressif, caractérisé par un réarrangement dans l'oncogène c-Myc, un taux de prolifération élevé et une incidence variable de l'infection par le virus EBV (Molyneux *et al.*, 2012).

L'EBV a été initialement découvert dans des biopsies d'un patient atteint de lymphome de Burkitt provenant d'Afrique subsaharienne (M. A. Epstein, B. G. Achong, 1964), où le BL est endémique et principalement associé à l'EBV.

Il existe trois types épidémiologiques de BL : endémique, sporadique et lié à l'immunodéficiences. Ils partagent la même morphologie et la principale altération chromosomique. Néanmoins, ils diffèrent par leur répartition géographique, leur épidémiologie, leurs profils moléculaires et leur association avec l'EBV. Le BL endémique est distribué dans des zones où la malaria est répandue. Il peut se retrouver dans l'Afrique équatoriale, la Papouasie-Nouvelle Guinée, et le nord du Brésil. Ces zones présentent des taux de précipitations annuels élevés et une acquisition précoce de l'EBV (Molyneux *et al.*, 2012). Cette forme de BL, qui atteint essentiellement les enfants, représente 30-50 % de tous les cancers chez les enfants en Afrique équatoriale. Le BL sporadique est réparti dans le monde entier et se manifeste de façon deux fois plus fréquente chez les enfants et les adultes jeunes (35 - 45 ans) que chez les sujets plus âgés. Le BL sporadique constitue 30 à 50 % des lymphomes de l'enfant et moins de 1 % des lymphomes non-hodgkiniens de l'adulte aux États-Unis (Marques-Piubelli *et al.*, 2020).

La translocation chromosomique du proto-oncogène Myc sur le chromosome 8 vers un gène d'immunoglobuline (Ig) est une caractéristique marquante du BL, quelle que soit son origine. Elle implique souvent le locus de la chaîne lourde de l'Ig sur le chromosome 14, ou les loci de la chaîne légère lambda ou kappa sur les chromosomes 2 ou 22. La translocation la plus répandue

est la t(8:14) et se produit dans 85 % des cas de BL. La translocation de Myc vers des régions régulatrices extrêmement actives des loci Ig conduit à des niveaux anormalement élevés d'expression de Myc et à une prolifération incontrôlée des cellules BL (Ontiveros *et al.*, 2014).

La malaria favorise le développement du BL endémique, notamment en raison de l'interaction de *Plasmodium falciparum* avec les lymphocytes B infectés par l'EBV. Les protéines membranaires érythrocytaires de *P. falciparum* sont capables d'induire la réactivation de l'EBV, et les ligands des récepteurs de *P. falciparum* induisent l'enzyme AID (*activation-induced cytidine deaminase*). La surexpression d'AID provoque des translocations Myc-Ig (Molyneux *et al.*, 2012). L'analyse de l'ensemble du génome a montré que les cas atteints de l'EBV ont un taux plus important d'hypermutations somatiques qui pourraient être liées à l'activation d'AID (Grande *et al.*, 2019).

En plus de la translocation de Myc, des mutations répétitives de l>ID3 (*DNA-binding protein inhibitor ID3*) et du facteur de transcription TCF-3 (*T Cell Factor -3*) sont partagées par le BL sporadique, le BL endémique, et le BL associé à l'immunodéficience (Schmitz *et al.*, 2012). La mutation de ces gènes altère l'hétérodimérisation inhibitrice normale d>ID3, ce qui aboutit à une signalisation du récepteur BCR indépendamment de l'antigène qui agit par l'intermédiaire de la phosphatidylinositol 3-kinase pour favoriser la survie et la prolifération des cellules (Onaindia, Medeiros and Patel, 2017). En outre, de nombreuses tumeurs de BL montrent des mutations au niveau du gène p53 et des altérations dans la voie de signalisation p53-ARF (Marques-Piubelli *et al.*, 2020).

Dans le cas du BL, l'EBV présente un programme de latence I très restreint d'expression des gènes viraux où EBNA-1 est la seule protéine exprimée de façon constante (Molyneux *et al.*, 2012; Onaindia, Medeiros and Patel, 2017). Il est suggéré que l'EBV joue un rôle initial dans la formation d'un pool de cellules B sensibles aux translocations Myc à partir de cellules B infectées et transformées (Polack *et al.*, 1996).

VI.1.2. Lymphome de Hodgkin (HL)

Le lymphome de Hodgkin (HL) se caractérise par la présence de lymphocytes anormaux, multinucléés, malins, qu'on nomme cellule de Hodgkin Reed-Sternberg (HRS), et qui sont entourés par des cellules B bénignes (**Figure 14**).

Le lymphome HL est classé en 2 groupes : le HL classique (cHL, *classic Hodgkin Lymphoma*) et le HL nodulaire (NLPHL, *Nodular lymphocyte predominant Hodgkin lymphoma*), avec des pourcentages d'environ 90 % et 10 %, respectivement. Le HL classique est divisé en quatre sous-types histologiques selon la nature de l'infiltrat, à savoir, le HL scléronodulaire (Ns-cHL, *Nodular sclerosing cHL*), le HL à cellularité mixte (Mc-cHL, *Mixed cellularity cHL*) et les deux sous-types les plus rares, le HL riche en lymphocytes (Lr-cHL, *Lymphocyte rich cHL*) et le HL pauvre en lymphocytes (Ld-cHL, *Lymphocyte depleted cHL*) (Shanbhag and Ambinder, 2018).

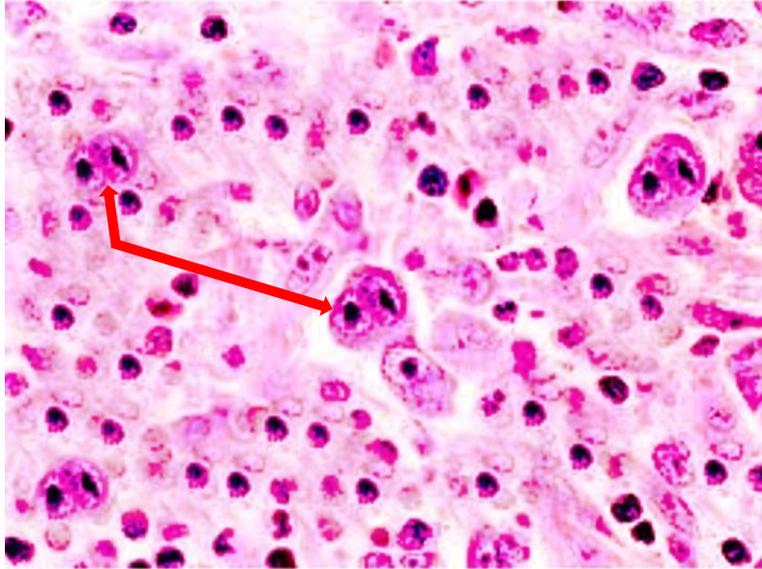


Figure 14. Lymphome de Hodgkin avec les cellules de Reed-Sternberg.

Les flèches rouges indiquent les cellules de Reed-Sternberg. Adaptée d'après (Aggarwal and Limaiem, 2022).

Dans les années 1980, le génome de l'EBV a été détecté dans les cellules de Reed-Sternberg par le chercheur Weiss et ses collègues (Weiss *et al.*, 1987). Au niveau mondial, environ 40 % des cas de HL classique sont associés à l'EBV, avec 80-90 % des cas pour le sous-type Mc-cHL, le sous-type majoritaire dans de nombreux pays en développement et qui a montré l'association la plus forte avec l'EBV. En revanche, moins de 20 % du sous-type Ns-cHL est lié au virus, ce qui réduit le taux global de corrélation de l'EBV avec le HL dans les pays développés à 30-35 % (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019).

Le HL associé à l'EBV est fréquemment trouvé chez des patients de moins de 10 ans (40-85 % des cas), de même que chez les patients de plus de 75 ans (45 % à 80 % des cas). Il est possible que la présence fréquente de l'EBV dans le HL chez les enfants et les patients âgés provienne, respectivement, d'un système immunitaire moins développé et sénescence (Glaser *et al.*, 1997). Lorsque le HL apparaît chez des patients infectés par le virus VIH, l'incidence de l'association à l'EBV devient supérieure à celle de la population générale, et presque tous ces HL du SIDA sont positifs à l'EBV et présentent typiquement le sous-type Mc-cHL (>90% des cas) (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019).

Les tumeurs HL positives à l'EBV ont un programme d'expression génétique virale de latence II et n'expriment donc que les protéines EBNA-1, LMP-1 et LMP-2. Les protéines LMP-1 et LMP-2A sont largement exprimées dans les cellules de Reed-Sternberg positives à l'EBV. On suppose que ces cellules dérivent des cellules B du centre germinatif et, dans les cas associés à l'EBV, elles présentent souvent des réarrangements anormaux de leur BCR de surface. L'incapacité à transmettre un signal par le BCR devrait normalement conduire à l'apoptose. Cependant, dans les cellules B infectées par l'EBV, LMP-1 et LMP-2A miment respectivement les récepteurs CD40 et BCR qui, indépendamment de la liaison au ligand, activent la signalisation

de CD40 et BCR (activation des voies canonique et non canonique de NF- κ B) et entraînent donc la survie des cellules HRS (Farrell, 2019).

Il convient de noter que les patients atteints d'une mononucléose infectieuse très symptomatique ont plus de chances de développer un HL lié à l'EBV (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019). De même, une charge virale élevée pendant la IM est associée à un risque important, à vie, de développer un HL (Mueller *et al.*, 2012).

VI.1.3. Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL)

Le lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL, *Diffuse large B cell lymphoma*) est le type le plus courant de lymphome non-hodgkinien, représentant globalement presque la moitié de l'ensemble des lymphomes non-hodgkiniens. Il s'agit d'un lymphome agressif affectant les lymphocytes B. Son incidence augmente avec l'âge et la plupart des patients ont plus de 60 ans au moment du diagnostic. Les DLBCL sont hétérogènes tant sur le plan clinique (ils peuvent survenir au niveau d'un ganglion lymphatique ou en extra-nodal, au niveau cutané, du système nerveux...), que morphologique (formes riches en lymphocytes T, histiocytes), phénotypique et moléculaire (DLBCL du médiastin, des séreuses) (Shibusawa, Kidoguchi and Tanimoto, 2021).

Différents sous-types ont été individualisés :

- Lymphome à grandes cellules riche en lymphocytes T
- DLBCL primitif du système nerveux central
- DLBCL cutané primitif, de type jambe
- DLBCL EBV positif du sujet âgé
- DLBCL NOS (*not otherwise specified*)

Le profilage de l'expression génique a permis de montrer que le DLBCL est constitué d'au moins trois sous-groupes, chacun ayant son propre mécanisme oncogénique et relevant donc d'une thérapeutique différente. Le sous-groupe « centrofolliculaire » ou GCB (*germinal center B cell*), semble provenir de cellules B normales issues du centre germinatif, alors que le sous-groupe « à cellules B activées » ou ABC (*activated B cell*) semble provenir de cellules B post-germinales arrêtées au cours de leur différenciation plasmocytaire. Le sous-groupe III est différent des deux autres et hétérogène. Le sous-groupe GCB est de meilleur pronostic que le sous-groupe ABC sous traitement de R-CHOP (Wright *et al.*, 2020).

En 2003, l'EBV a été reconnu dans les DLBCL pour la première fois dans une étude de tumeurs survenant chez des patients japonais âgés, alors qu'il est maintenant évident que la pathologie positive à l'EBV survient également, bien que moins fréquemment, chez des personnes plus jeunes (Oyama *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2014). Il est à noter que jusqu'à 10 % de tous les DLBCL sont désormais reconnus comme étant positifs à l'EBV, surtout dans le sous-type ABC du DLBCL. De ce fait, tous les DLBCL associés à l'EBV sont classés dans un groupe distinct, appelé actuellement "EBV+DLBCL, NOS » pour refléter leur pathogénie distincte (Castillo *et al.*, 2016; Swerdlow *et al.*, 2016).

Toutefois, même au sein du groupe « EBV+DLBCL, NOS », on observe une certaine diversité. Chez les patients âgés, l'EBV présente une latence III, confirmant la théorie selon laquelle la propagation de la tumeur est une conséquence de la réduction de la surveillance des lymphocytes T spécifiques à l'EBV, qui fait partie du processus général de baisse de compétence des lymphocytes T qui se produit avec l'âge (immunosénescence). C'est la forme du DLBCL le plus associé à l'EBV avec 100 % des cas. En outre, les DLBCL positifs à l'EBV chez les jeunes patients présentent plus souvent un EBV en latence II, ce qui implique une voie plus complexe du développement de la tumeur (Oyama *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2014; Castillo *et al.*, 2016).

Au sein des DLBCL, on peut aussi individualiser un lymphome B appelé « AIDS-DLBCL » (l'incidence du DLBCL est significativement plus importante chez les personnes VIH-positives). Il a été montré que les DLBCL peuvent apparaître à n'importe quel stade de l'infection par le VIH et sont positifs à l'EBV (30-35 % des cas). Il est également intéressant de signaler que ces AIDS-DLBCL peuvent présenter une latence virale de type I, II ou III (Arvey *et al.*, 2015).

De nombreuses autres tumeurs malignes de type DLBCL liées à l'EBV, plus rares, ont été identifiées. L'un d'entre eux, officiellement appelé DLBCL associé à une inflammation chronique (DLBCL-CI, *DLBCL associated with chronic inflammation*), a été décrit pour la première fois chez des patients ayant une longue histoire de pyothorax pendant le traitement de la tuberculose (Loong *et al.*, 2010), mais a maintenant été observé dans d'autres maladies inflammatoires chroniques (Shannon-Lowe, Rickinson and Bell, 2017). La plupart des DLBCL survenant dans un contexte d'immunodépression (DLBCL EBV positif du sujet âgé, DLBCL associés à une inflammation chronique, granulomatoses lymphoïde) sont associés à l'EBV et le virus semble y jouer un rôle primordial (Aozasa, Takakuwa and Nakatsuka, 2005; Boyer *et al.*, 2017).

VI.1.4. Lymphomes NK/T

Les tumeurs malignes des cellules NK/T présentent au moins quatre formes distinctes : le lymphome systémique à cellules T positives à l'EBV de l'enfant (STLC, *systemic EBV-positive T-cell lymphoma of childhood*), le lymphome extraganglionnaire à cellules NK/T (*ENKTL, extranodal NK/T cell lymphoma*), le lymphome ganglionnaire primaire et la leucémie agressive à cellules NK (*ANKL, aggressive NK leukemia*) (Shannon-Lowe, Rickinson and Bell, 2017; Kimura and Fujiwara, 2019).

Le STLC est extrêmement rare mais très agressif. Il se caractérise par le développement d'une croissance clonale de cellules T auxiliaires (Th, *T helper*) ou, plus souvent, de lymphocytes T cytotoxiques (Tc, *T cytotoxic*) infectés par l'EBV. La plupart de ces maladies sont associées à une primo-infection virale touchant les enfants ou les jeunes adultes, mais elles peuvent aussi se manifester plus tardivement, comme conséquence d'une infection chronique-active à EBV CAEBV (*chronic active EBV*) (Quintanilla-Martinez *et al.*, 2000; Dojcinov, Fend and Quintanilla-Martinez, 2018). Dans cette maladie l'EBV est décrit en latence I/II, avec expression de la protéine LMP-1 qui peut parfois être détectée par coloration. Les signatures moléculaires de ces cellules n'ont pas encore été déterminées, du fait de la rareté de la pathologie (Dojcinov, Fend and Quintanilla-Martinez, 2018).

Le lymphome extra-ganglionnaire à cellules NK/T (ENKTL) fait partie de l'ensemble des lymphomes nasaux les plus fréquents dans les zones endémiques. Il représente jusqu'à 10 % de tous les lymphomes NHL dans certaines régions d'Asie et d'Amérique centrale, alors qu'il est plus rarement trouvé aux États-Unis et en Europe (<1 % de tous les NHL) (Au, 2010). La plupart des ENKTL surviennent au niveau de la cavité nasale. Ils peuvent également se développer dans des territoires extranasaux comme la peau, le tube digestif, les testicules, les poumons, etc., et se développer au détriment de divers organes. La plus grande partie des ENKTL nasaux et de nombreux ENKTL extra-nasaux sont d'origine cellulaire NK (85 et 50 % respectivement), tandis que le reste concerne principalement les cellules Tc. Les cellules montrent une latence virale de type I/II avec une expression à des degrés variables de la protéine LMP-1 qui est impliquée dans le phénotype d'hyperméthylation, caractéristique des ENKTL. L'analyse génomique a mis en évidence la suppression épigénétique de certains gènes régulateurs du cycle cellulaire dans la tumeur, ainsi que des mutations et/ou des délétions récurrentes affectant le plus souvent des membres de la voie de signalisation JAK/STAT (Jak3, STAT3 et STAT5B) et l'ARN hélicase DDX3X (Asano, Kato and Nakamura, 2013; Li *et al.*, 2018).

Selon la classification de l'OMS, le lymphome ganglionnaire primitif à cellules NK/T positives à l'EBV a été inclus dans le sous-groupe provisoire « lymphome périphérique à cellules T, non spécifié » (PTCL, NOS, *Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified*). Ces lymphomes diffèrent des ENKTL à plusieurs niveaux. Ils proviennent souvent de cellules T plutôt que de cellules NK. En plus, la participation nasale/extra-ganglionnaire est rare et ils n'ont pas le caractère angio-destructif des tumeurs nasales. Cependant, ces tumeurs ganglionnaires représentent une maladie extrêmement agressive, avec une durée de survie moyenne de 4 mois (Ng *et al.*, 2018).

La leucémie agressive à cellules NK (ANKL) est une tumeur très rare. Elle se manifeste généralement chez les adolescents qui présentent différents symptômes (fièvre, pancytopénie et hépatosplénomégalie). L'évolution de cette pathologie est rapide, avec une défaillance de plusieurs organes et une coagulation intravasculaire disséminée. Elle est extrêmement agressive et le décès survient dans un délai de deux mois. La plupart des ANKL sont associés à une infection des cellules NK par l'EBV en phase de latence I/II (Ryder *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2014). Les cellules cancéreuses présentent de nombreuses altérations chromosomiques, et une délétion fréquente sur le chromosome 6q21-25. L'analyse génétique de l'ANKL a montré une série de mutations très semblables à celle trouvées dans l'ENKTL, notamment dans la voie de signalisation JAK/STAT et DDX3 (Ishida, 2018).

VI.1.5. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD)

Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLD, *Post-Transplant Lymphoproliferative Disease*) surviennent chez des patients ayant bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une transplantation allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Les PTLD constituent un groupe hétérogène de pathologies lymphoïdes et plasmocytaires présentant des proliférations polyclonales à monoclonales (Al-Mansour, Nelson and Evens, 2013).

Selon la classification de l'OMS, les PTLD sont classés physiologiquement en quatre groupes hétérogènes : lésions non destructives/précoces, lésions polymorphes, lésions monomorphes et lymphome de Hodgkin classique.

L'incidence globale des PTLD chez les personnes transplantées est de 1-3 %. Dans une transplantation d'organes solides, cette incidence varie en fonction du type d'organe et peut aller jusqu'à 10-15 %. Chez les personnes ayant reçu une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques, le PTLD serait beaucoup moins fréquent (0,5-2,5 %) (Singavi, Harrington and Fenske, 2015).

La majorité des PTLD sont liées à une infection par l'EBV (55-70% des cas) (Grulich and Vajdic, 2015; Singavi, Harrington and Fenske, 2015; Koff *et al.*, 2018). L'infection par l'EBV est souvent antérieure à la greffe et réactivée par les traitements immunosuppresseurs, mais elle peut être acquise après la greffe, tout particulièrement chez les enfants (Morscio and Tousseyn, 2016). Elle peut se produire entre 2-6 mois après la transplantation dans le cas des cellules souches hématopoïétiques, alors qu'elle survient plutôt entre 30-40 mois après la transplantation dans le cas d'organes solides (Al-Mansour, Nelson and Evens, 2013; Singavi, Harrington and Fenske, 2015).

La plupart des cas de PTLD sont d'origine cellulaire B, mais il peut aussi s'agir de cellules NK/T (Al-Mansour, Nelson and Evens, 2013; Singavi, Harrington and Fenske, 2015).

Chez les patients souffrant de PTLD, l'EBV présente normalement une latence de type III, avec l'expression d'EBER et de tous les protéines EBNA et LMP. Mais l'EBV peut développer une latence plus restreinte (I ou II) (Morscio and Tousseyn, 2016; Crombie and LaCasce, 2019).

VI.2. Carcinomes liés à l'EBV

VI.2.1. Carcinome nasopharyngé (NPC)

Le carcinome du nasopharynx (NPC) est un cancer des cellules épithéliales du nasopharynx qui recouvrent l'arrière de la cavité nasale : il est très agressif et métastatique. Il se caractérise par la présence de cellules cancéreuses indifférenciées et une très riche infiltration de lymphocytes.

L'incidence de la tumeur est relativement élevée en Asie du Sud-Est et en Afrique du Nord et de l'Est, et elle atteint son maximum dans les populations chinoises du Sud. Par contre, elle est faiblement présente en Occident. On estime que cette tumeur est à l'origine d'environ 80 000 nouveaux cas de cancer par an au niveau mondial (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019).

Ce carcinome est divisé, selon la dernière classification de l'OMS, en trois principaux types histologiques : le carcinome épidermoïde kératinisant, le carcinome non kératinisant et le carcinome indifférencié (Swain *et al.*, 2020).

Les NPC indifférenciés sont souvent désignés comme un lymphoépithéliome du nasopharynx en se caractérisant par une infiltration lymphocytaire importante. Ils sont tous associés à l'EBV, quelle que soit la région considérée, et le génome viral est présent dans toutes les cellules malignes contrairement aux NPC non kératinisants où l'EBV n'est trouvé présent que dans les zones endémiques (Tsao, Tsang and Lo, 2017).

L'expression des gènes viraux dans les cellules tumorales de NPC révèle une latence II. Ainsi, toutes ces cellules expriment les protéines EBNA-1, LMP-1, et LMP-2, les EBER non codants, et les BART (Raab-Traub, 2015; Tsao, Tsang and Lo, 2017). C'est d'ailleurs dans des xénogreffes de NPC ainsi que dans des biopsies de NPC que les ARN BART ont initialement été détectés (Hitt *et al.*, 1989; Gilligan *et al.*, 1991). Les miARN BART, qui sont présents à des taux inhabituellement élevés dans les xénogreffes de NPC, semblent avoir une action positive sur leur croissance *in vivo* (Cosmopoulos *et al.*, 2009; Qiu *et al.*, 2015), alors que les protéines LMP joueraient un rôle important dans leur capacité à stimuler la croissance des cellules épithéliales infectées dans des modèles *in vitro* (Pegtel *et al.*, 2005; Fotheringham, Coalson and Raab-Traub, 2012).

VI.2.2. Carcinome gastrique (GC)

Les carcinomes gastriques (GC) diffèrent dans leur histologie et leur distribution dans l'estomac. Ils peuvent se retrouver soit dans des sites proximaux (cardia) ou, plus fréquemment, distaux (non-cardia) (de Martel, Forman and Plummer, 2013).

Les cellules tumorales infectées par le virus de l'EBV sont surtout trouvées chez les hommes. Elles sont localisées plus fréquemment dans le corps de l'estomac (le cardia) que dans les sites distaux et montrent un taux plus faible de présence dans les ganglions lymphatiques (Lee *et al.*, 2009; Fukayama and Ushiku, 2011).

Globalement, les tumeurs GC sont associées à l'EBV avec 10 % des cas (Shannon-Lowe and Rickinson, 2019). Le GC présente un petit sous-groupe, riche en infiltrat lymphocytaire entre les cellules épithéliales gastriques (LELC, *Lymphoepithelioma-like carcinoma*), ressemblant à celui observé dans le NPC. Ces LELC représentent 1-4 % de tous les carcinomes gastriques et sont associés à l'EBV dans plus de 90 % des cas (Murphy *et al.*, 2009). En revanche, la majorité des tumeurs GC sont classées dans la catégorie des "adénocarcinomes conventionnels" et ne ressemblent pas aux LELC. Environ 5-15 % de cette catégorie plus courante est associée à l'EBV (Camargo *et al.*, 2011).

L'EBV est trouvé en latence II au sein du GC et les ARN BART y sont fortement exprimés pouvant induire cette tumeur (Strong *et al.*, 2013; Marquitz *et al.*, 2015). Il a été supposé que l'EBV entraîne des changements oncogènes par des modifications épigénétiques du génome de la cellule hôte, surtout en bloquant des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *p16* et *E-cadhérine* (Kaneda *et al.*, 2012). De même, l'EBV inhibe le gène cellulaire *PI3KCA* (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*) qui code pour un régulateur principal de la voie de signalisation PI3K/Akt (Wang *et al.*, 2011).

Il est possible que l'inflammation locale favorise la transmission de l'EBV par réactivation lytique dans le réservoir des lymphocytes B (Ribeiro *et al.*, 2017).

VII. Lymphome T angio-immunoblastique (LAI)

VII.1. Introduction

Au cours de la première moitié des années 1970, le lymphome T angio-immunoblastique (LAI) a été dénommé maladie « immunodysblastique », lymphadénopathie angio-immunoblastique avec dysprotéïnémie (AILD, *angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia*) ou lymphadénopathie immunoblastique (IBL, *immunoblastic lymphadenopathy*). Les chercheurs ont initialement suggéré que la maladie était une réaction hyperimmune sans rapport avec le cancer. Cependant, ils ont rapidement constaté que cette maladie était caractérisée par une grande diversité histologique et ont supposé, chez plusieurs patients, que la maladie pouvait être néoplasique, sans pouvoir le démontrer. Ultérieurement, certains patients atteints d'AILD/IBL ont été identifiés comme ayant un lymphome malin provenant soit de cellules B, soit de cellules T (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

En 1994, le nouveau terme « lymphome T angio-immunoblastique » a été utilisé dans la classification des néoplasmes lymphatiques REAL (*Revised European and American Lymphoma classification*) et ensuite dans les classifications de l'OMS dans les années 2000 (Harris *et al.*, 1994; Campo *et al.*, 2011).

L'analyse d'expression des gènes dans les tissus entiers de LAI et dans des cellules tumorales isolées a identifié l'origine du LAI comme étant des cellules T folliculaires auxiliaires (T_{FH}, *Follicular T Helper*) (de Leval *et al.*, 2007).

Des études ont montré une similarité de mutations dans les LAI, les lymphomes T folliculaires (FTCL, *follicular T-cell lymphoma*) et dans un sous-groupe de lymphomes classés, d'après la classification de l'OMS de 2008, comme des lymphomes T périphériques non spécifiés (PTCL-NOS, *peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified*) avec un phénotype de T_{FH}. Ensuite, la classification de l'OMS de 2016 regroupe trois types de maladies, LAI, FTCL et le PTCL ganglionnaire de phénotype T_{FH} nouvellement défini (nPTCL-T_{FH}, *newly defined nodal PTCL with Tfh phenotype*), et elle exclut le PTCL-NOS du nPTCL-T_{FH} (Swerdlow *et al.*, 2016; Dobay *et al.*, 2017).

Les LAI sont extrêmement agressifs, puisque les patients ont une survie médiane inférieure à 3 ans. En effet, seulement 10-30 % des patients sont encore vivants cinq ans après le diagnostic (Lunning and Vose, 2017). Sur le plan clinique, les patients décèdent fréquemment de complications infectieuses issues de la dérégulation de leur système immunitaire provoquée par le LAI. Ils sont aussi susceptibles de développer des lymphoproliférations à lymphocytes B infectés par l'EBV, notamment des DLBCL ou des tumeurs plasmocytaires. Dans ce cas, ce sont les complications liées au DLBCL qui provoquent majoritairement la mortalité des patients plus que le LAI lui-même (de Leval and Gaulard, 2008).

Les LAI présentant une expression élevée de gènes immunosuppresseurs comme *VSIG4* (*V-set and immunoglobulin domain containing 4*), un inhibiteur sécrété par les cellules dendritiques et important dans l'activation des cellules T, ou *PDGFR α/β* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor, alpha or beta polypeptide*), récepteur cellulaire régulant les signaux prolifératifs, sont de mauvais pronostic (Iqbal *et al.*, 2010).

Par contre, le LAI présente un bon pronostic lorsque les gènes *BTLA4* (*B and T Lymphocyte Attenuator 4*) et *SYK* (*Spleen Associated Tyrosine Kinase*), qui entraînent l'inhibition des fonctions des cellules myéloïdes, sont extrêmement exprimés (Iqbal *et al.*, 2010).

VII.2. Épidémiologie

Le LAI est donc un lymphome rare, agressif, de mauvais pronostic. Il correspond à 15-20% des PTCL, qui, eux-mêmes, constituent 15% de tous les lymphomes (Federico *et al.*, 2013; de Leval *et al.*, 2015). De ce fait, le LAI représente un faible taux de l'ensemble des NHL (1-2 %) (Lunning and Vose, 2017).

Ce lymphome est plus fréquent en Europe qu'en Amérique du Nord ou en Asie, où il constitue respectivement 28.7 %, 16 % et 17,9 % des PTCL (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020). À ce jour, les raisons de cette diversité dans les différentes régions du monde restent inconnues. En effet, aucun élément causal, aucun facteur de risque ni aucune prédisposition raciale n'ont été déterminés.

Par ailleurs, le LAI affecte majoritairement les personnes âgées (≥ 62 ans) avec une répartition égale hommes - femmes (Federico *et al.*, 2013).

VII.3. Architecture du ganglion lymphatique

Le LAI se caractérise par une dégradation partielle ou complète de la structure normale des ganglions lymphatiques atteints, et trois types peuvent être définis: type 1 (follicules hyperplasiques), type 2 (déplétion de follicules) et type 3 (aucun follicule). Ces différentes formes pourraient refléter des stades évolutifs distincts (de Leval, 2020).

L'architecture du ganglion lymphatique se caractérise également par la formation d'un infiltrat polymorphe constitué de cellules épithélioïdes, d'histiocytes, d'éosinophiles, de lymphocytes T atypiques, de plasmocytes, de cellules B et de grands immunoblastes. En outre, il présente un vaste réseau de veinules HEV (*High Endothelial Venules*), et une prolifération de cellules dendritiques folliculaires (FDC, *Follicular dendritic cells*) dans 95 % des cas (Lunning and Vose, 2017).

Les cellules néoplasiques, occasionnellement infectées par l'EBV, sont de petites cellules T folliculaires auxiliaires avec un cytoplasme clair et abondant. Ces cellules sont situées à

proximité des veinules HEV et participent essentiellement à l'activation et à la différenciation des lymphocytes B dans le GC (de Leval, 2020).

VII.4. Mutations génétiques

L'analyse moléculaire montre que les LAI sont caractérisés par de nombreuses mutations fréquentes. Sur le plan fonctionnel, on constate que différentes mutations favorisent respectivement la spécification et la différenciation des cellules T_{FH} qui pourraient ainsi contribuer significativement à l'oncogénicité des LAI. Plusieurs mutations majeures sont détaillées.

Le gène *TET2* (*tet methylcytosine dioxygenase 2*) est fréquemment muté dans les LAI. Il présente des variations somatiques dans ~80 % des cas. Il a été révélé que l'inhibition de l'enzyme Tet2 provoque la surexpression du gène *Bcl6* via l'hyperméthylation d'une région intronique silencieuse de *Bcl6* et déclenche une différenciation anormale des cellules T_{FH}. Les mutations de *TET2* peuvent toucher toutes les étapes du développement des lymphocytes T (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020; Tari, Lemonnier and Morschhauser, 2021).

Une mutation somatique de la protéine RHOA (*GTPase ras homology family member A*), qui participe à la réorganisation du cytosquelette, est retrouvée dans 50-70 % des LAI. Cette mutation se traduit par une substitution de Gly en Val au niveau de l'acide aminé 17 (Gly17Val), ce qui renforce la signalisation du TCR et de l'ICOS (*inducible T cell co-stimulator*), probablement par des voies indépendantes et favorise la spécification des cellules T_{FH} et le maintien du phénotype T_{FH}. En plus, elle augmente la prolifération des lymphocytes T_{FH} du LAI et leur capacité à se propager (Timmins, Wagner and Ahearne, 2020). Les mutations de *TET2* et *RHOA* peuvent renforcer la différenciation des cellules T_{FH} à partir des lymphocytes CD4+ naïfs.

Par ailleurs, les mutations du gène *IDH2* (*isocitrate dehydrogenase 2*) sont présentes dans 20-30% des LAI où elles bloquent indirectement l'activité dioxygénase dépendante du fer et de l' α KG (*α -ketoglutarate*). Elles sont également identifiées chez des patients présentant des mutations sur *TET2*, ainsi qu'une hyperméthylation des régions promotrices du génome entier et des histones (Willemsen *et al.*, 2018).

En outre, *DNMT3A* (*DNA Methyltransferase 3A*) est muté dans les LAI à une fréquence de 20-38,5 %. Pour le moment, il n'a pas été montré que les mutations de *DNMT3A* perturbent directement la spécification et la différenciation des cellules T_{FH}. En revanche, il est remarquable de constater que les mutations de *DNMT3A* sont associées à des mutations de *TET2* dans les cellules T_{FH} (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

Des variations au niveau des gènes associés à la signalisation du TCR sont observées dans la moitié des cas de LAI, tels que *CD28*, *FYN*, *PLCG1*, et *VAV1*. Ces mutations peuvent favoriser le développement du LAI (Tari, Lemonnier and Morschhauser, 2021).

D'autre part, un réarrangement clonal des gènes du TCR et des gènes du BCR peut être observé respectivement, dans 75-90% et 25-30% des cas (Oon *et al.*, 2021).

VII.5. Relations entre LAI et EBV

L'EBV est détecté dans 85-95 % des cas de LAI. Il se trouve principalement dans les immunoblastes B qui ressemblent aux cellules B de HRS et occasionnellement dans les lymphocytes T néoplasiques (Anagnostopoulos *et al.*, 1992; Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

La participation de l'EBV dans la pathogenèse du LAI est encore mal connue et les théories cherchant à expliciter cette relation sont diverses (Nakhoul *et al.*, 2019). Un certain nombre d'auteurs pensent que l'EBV est directement associé à la survenue du LAI, alors que d'autres montrent que ce virus n'est pas impliqué dans la transformation cellulaire et que sa présence est un phénomène secondaire provenant de l'immunodéficience déclenchée par la maladie LAI (Lammoglia Cobo *et al.*, 2022).

En 2007, des chercheurs ont avancé que l'EBV avait probablement un rôle causal dans le LAI et que l'initiation de la croissance des cellules T pouvait être attribuée à un antigène (Dunleavy, Wilson and Jaffe, 2007). Cette hypothèse est fondée sur des études qui ont démontré la détection très précoce de lymphocytes B infectés par l'EBV dans la tumeur durant la maladie et sur l'association quasi-constante LAI - EBV (Jaffe, 2006; Willenbrock, Bräuninger and Hansmann, 2007).

Les cellules B positives pour l'EBV présentent en effet des protéines virales (comme EBNA-1 et LMP-1) en liaison avec les molécules du HLA de classe II aux cellules T_{FH}. Cet événement stimule l'activation des cellules T_{FH} en conduisant à la production de la chimiokine CXCL13 (*C-X-C motif chemokine ligand 13*), qui favorise le transport et l'activation des lymphocytes B dans le ganglion lymphatique. La prolifération des lymphocytes B EBV positifs pourrait entraîner la génération de cellules T_{FH} indépendantes de l'antigène EBV (Dunleavy, Wilson and Jaffe, 2007).

Par contre, de nombreux patients atteints de LAI présentent une immunodépression caractérisée par un déficit en lymphocytes T circulants, probablement induite par la maladie elle-même. Cette défaillance immunitaire est susceptible de déclencher une infection ou une réactivation de l'EBV, entraînant une prolifération de ces cellules B et l'émergence secondaire de cellules B transformées liées à l'EBV. Ces lymphomes se caractérisent par une expansion des lymphocytes B ainsi que des populations de lymphocytes T cancéreux. L'EBV présente une phase de latence de type II/III, en exprimant la protéine LMP-1 et plus fréquemment la protéine EBNA-2, et les transcrits EBER (Huang *et al.*, 2012; Gru *et al.*, 2015).

En outre, l'EBV code des cytokines et des récepteurs semblables à leurs homologues cellulaires, comme la protéine virale BCRF1 qui est homologue à l'IL10 humaine. Ce virus, par ces protéines, est susceptible de jouer un rôle fondamental dans l'évolution de la pathologie. De même, l'EBV peut réguler la production de molécules par les lymphocytes et les cellules inflammatoires, comme les IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, IL-12, l'IFN- γ ... (Rojas *et al.*, 2017; Jog *et al.*, 2018).

VII.6. Traitement

Comme nous l'avons déjà mentionné, le pronostic du LAI est généralement mauvais. Il semble qu'il n'y ait pas de stratégie de traitement très efficace. Toute une gamme de chimiothérapies combinées peut être utilisées.

La première ligne de traitement repose généralement sur une multichimiothérapie à base de CHOP (cyclophosphamide, doxorubicine, vincristine et prednisone) qui procure un taux de réponse complète (RC, *complete response*) de 53 % dans le cadre d'un premier traitement de LAI (Lunning and Vose, 2017).

En outre, le traitement par CHOP peut être intensifié par l'addition d'autres médicaments anticancéreux. En admettant que les lymphocytes B contribuent significativement à la stimulation et au développement du LAI, il est légitime d'associer du rituximab au CHOP ; cette association a permis d'élever le taux de réponse globale (ORR : *Overall Response Rates*) à 80% dans un essai clinique de phase 2 (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

Des résultats similaires sont obtenus par l'addition d'étoposide (inhibiteur des topoisomérases I et II) au CHOP et l'ORR est de 82 % (D'Amore *et al.*, 2012). Dans le cas de la combinaison romidepsine (inhibiteur d'histone désacétylase) - CHOP, le taux de rémission complète s'est avéré plus faible (51%) que celui obtenu avec CHOP seul et les effets secondaires plus fréquents (Dupuis *et al.*, 2015; Bachy *et al.*, 2022). Le bélinostat, autre inhibiteur d'histone désacétylase, est aussi essayé.

Les traitements d'inhibition des points de contrôle immunitaires constituent également un intérêt. Dans la plupart des cas de LAI, les lymphocytes néoplasiques T_{FH} sont porteurs de la protéine PD-1, qui peut jouer un rôle dans la migration des lymphocytes T_{FH} ou dans l'activation de la voie de signalisation NF- κ B dans les lymphocytes B portant la protéine ligand PD-L1. De ce fait, le nivolumab, un anticorps anti-PD1, a été testé sur douze patients atteints de PTCL dans un essai clinique de phase 2. Six parmi ces douze patients étaient porteurs de LAI. Parmi ces six patients, une RC a été obtenue. Par contre, une maladie hyperprogressive (évolution rapide dans un cycle de traitement) a été signalée chez au moins un patient LAI (Bennani *et al.*, 2019).

Les traitements hypométhylants, la 5-azacytidine (Aza) et la décitabine corrigent l'hyperméthylation de l'ADN liée aux mutations des régulateurs épigénétiques, dont TET2 et IDH2. En théorie, les agents hypométhylants sont donc efficaces dans les pathologies portant des mutations de TET2 et sont autorisés dans le traitement des syndromes myélodysplasiques avec mutations TET2 (Cedena *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017). Ce traitement peut être plus recommandé dans les LAI que dans les syndromes myélodysplasiques, du fait du nombre de mutations TET2 plus élevé dans les LAI (Lemonnier *et al.*, 2018). Dans un essai clinique de phase 2, la combinaison d'Aza par voie orale et de romidepsine ont également montré un résultat très positif pour les patients atteints de PTCL (ORR chez 8 des 11 patients), dont certains souffrant de LAI (O'Connor *et al.*, 2019).

Par ailleurs, l'inhibiteur plurikinase « dasatinib » empêche les tyrosine kinases de la famille Src (notamment FYN et LCK) de provoquer la phosphorylation de VAV1 au niveau du

récepteur TCR. L'hyperphosphorylation de VAV1 a été précédemment identifiée en tant que mécanisme permettant aux mutants RHOA de développer le lymphome LAI (Fujisawa *et al.*, 2018). Le dasatinib a été utilisé chez des patients LAI dans des essais cliniques de phase 1 et a montré un résultat favorable : quatre sur cinq ont répondu au dasatinib (Nguyen *et al.*, 2020).

Le duvelisib, un agent inhibiteur de PI3K δ qui empêche le déclenchement de la voie de signalisation ICOS-PI3K, peut être considéré comme un traitement contre le développement du LAI (Pro *et al.*, 2020).

De nombreux agents, anticorps, etc. peuvent également être utilisés, en ciblant les lymphocytes néoplasiques, les cellules environnementales, ou les deux. Étant donné que les cellules tumorales du LAI expriment le marqueur CD30 dans 46-80% des cas (Karube *et al.*, 2021), le brentuximab védotine, médicament ciblant cette molécule est actuellement en cours d'essai sur le LAI, seul ou en association.

La prévention de l'interaction entre les différentes cellules peut aussi être la meilleure stratégie (Cortes *et al.*, 2018).

Enfin, l'autogreffe ou l'allogreffe de moelle osseuse peuvent être proposées aux patients les plus jeunes, alors que les traitements moins agressifs sont réservés aux patients âgés.

Partie 2 : Les exosomes dérivés de cellules tumorales infectées par l'EBV (Les exosomes en tant que médiateurs de la communication intercellulaire)

I. Vésicules extracellulaires et différents types de vésicules

Il est bien connu que les cellules peuvent communiquer entre elles en sécrétant dans l'environnement extracellulaire une variété de vésicules appelées vésicules extracellulaires (EV, *extracellular vesicles*), des petites molécules comme des sels et des cofacteurs, et des complexes macromoléculaires (Schorey and Bhatnagar, 2008; Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012; van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Les EV sont de petites particules de taille comprise entre 30-1000 nm. Les EV sont sécrétées par différents types de cellules et sont de divers types selon l'origine des cellules et leur état au moment de la sécrétion, par exemple, transformées, différenciées, stimulées ou stressées. Elles ne sont plus répertoriées en fonction de leur taille (Mittelbrunn and Sánchez-Madrid, 2012; Tang *et al.*, 2017; Teow *et al.*, 2017).

Dans des conditions normales, ces vésicules peuvent être sécrétés par la plupart des cellules eucaryotes, notamment les cellules endothéliales, les cellules épithéliales, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les cellules dendritiques, les réticulocytes, les cellules musculaires lisses, les neurones, les oligodendrocytes et les astrocytes (Johnstone, Bianchini and Teng, 1989; Escola *et al.*, 1998; Théry *et al.*, 1999; Blanchard *et al.*, 2002; Fauré *et al.*, 2006; Krämer-Albers *et al.*, 2007; Walker, Maier and Pober, 2009; G. Wang *et al.*, 2012; Comelli *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2016). Dans des conditions pathologiques, les cellules anormales telles que les cellules cancéreuses et les cellules infectées par des virus, comme les cellules B infectées par le virus EBV, peuvent également produire des vésicules pour leur propre avantage (Minciacchi, Freeman and Di Vizio, 2015; Gill, Catchpole and Forterre, 2019).

Plus précisément, les EV peuvent être classées en trois grands groupes en fonction de leur mode de production : les exosomes, les microvésicules et les corps apoptotiques (**Figure 15**). Les exosomes, de diamètre 30-150 nm, résultent de l'invagination de la membrane endosomique et sont libérés par la fusion des corps multivésiculaires (MVB, *multivesicular bodies*) et des membranes plasmiques. Les microvésicules (50-1000 nm de diamètre) sont produites par le bourgeonnement de la membrane des vésicules directement vers l'extérieur des membranes plasmiques. Les corps apoptotiques (800-5000 nm de diamètre) sont formés par la voie apoptotique et libérés directement de la membrane plasmique des cellules apoptotiques (Gill, Catchpole and Forterre, 2019).

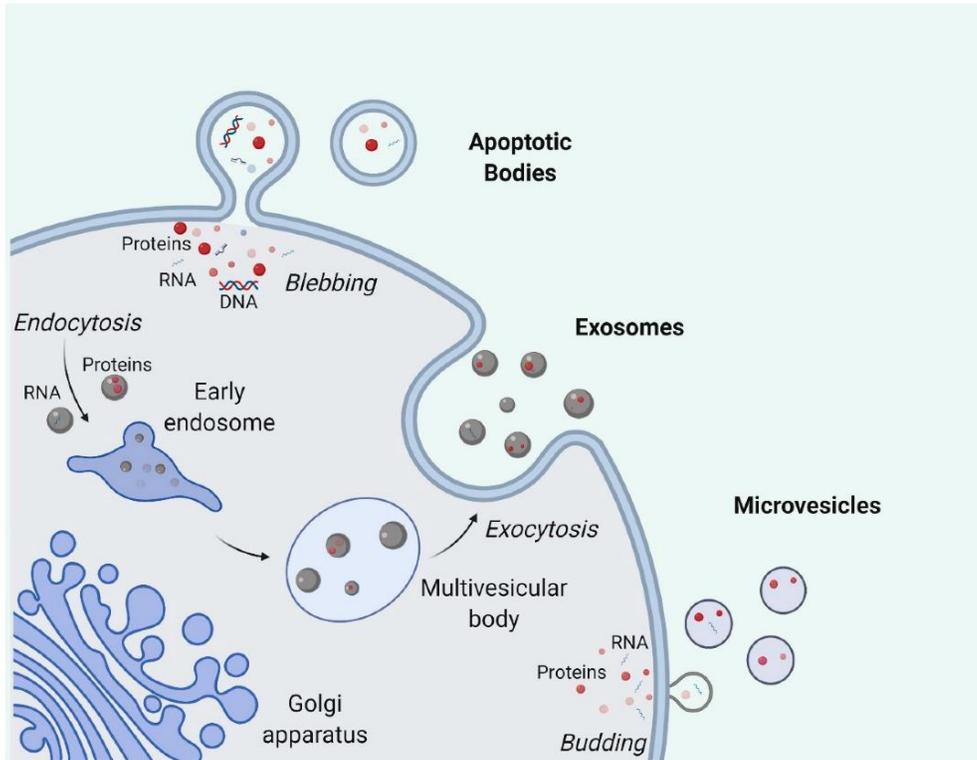


Figure 15. Schéma représentant les différents types de vésicules extracellulaires.

D'après (Dang *et al.*, 2020).

II. Exosomes

Les exosomes, sont de petites vésicules sphériques liées à la membrane. Ils sont le plus récent membre de la famille des "vésicules bioactives" qui transportent un large éventail de molécules et facilitent la communication intercellulaire, en jouant un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires, comme la réponse immunitaire et la transduction des signaux (Schorey and Bhatnagar, 2008; Gangoda *et al.*, 2015; Greening *et al.*, 2015). Ces vésicules sont en effet capables de protéger la dégradation rapide des acides nucléiques et demeurent très stables dans le plasma. Ces ADN ou ARN provenant des exosomes sérologiques peuvent ensuite être utilisés pour la détection de mutations associées au cancer, et devient ainsi un biomarqueur pour le diagnostic du cancer. En plus, plusieurs études ont déterminé des protéines et des ARN riches en exosomes issus du cancer qui jouent le rôle de biomarqueurs pouvant être utilisés dans la surveillance et le pronostic de la réponse au traitement (Muthu *et al.*, 2021). Par contre, ces exosomes peuvent contribuer à aggraver le développement et la dissémination des tumeurs et à la pathogenèse de diverses maladies et infections en transportés des molécules cancéreuses ou virales aux cellules saines (Schorey and Bhatnagar, 2008). Dans les années 1980, Dr Rose Johnstone a été la première à découvrir la sécrétion des exosomes par les réticulocytes de mouton au cours de leur différenciation (Pan and Johnstone, 1983; Harding, Heuser and Stahl,

1984; Johnstone *et al.*, 1987). Ces exosomes sont sécrétés par la plupart des types de cellules *in vitro*, et se trouvent également à l'état naturel dans les fluides corporels, notamment le sérum, le plasma, le liquide amniotique, l'ascite, la bile, le lait maternel, le liquide céphalorachidien, les sécrétions nasales, la salive, le sperme, les larmes et l'urine, en très grand nombre (Ogawa *et al.*, 2008; Nilsson *et al.*, 2009; Lässer *et al.*, 2011; Vlassov *et al.*, 2012; Palazzolo *et al.*, 2018). Plus récemment, il a été démontré qu'ils sont libérés par d'autres cellules hématopoïétiques, notamment les lymphocytes B et T, les cellules dendritiques (DC), les plaquettes et les mastocytes. Plusieurs recherches ont récemment montré que les cellules non hématopoïétiques ont également la capacité de sécréter des exosomes, comme les cellules épithéliales intestinales, les cellules neurogliales et les cellules tumorales (Caby *et al.*, 2005).

II.1. La voie exosomale

Le processus impliqué dans la biogenèse et la sécrétion des exosomes est appelé la voie exosomale (Zheng *et al.*, 2019). Cette voie peut être divisée en quatre étapes : l'initiation, l'endocytose, la formation de MVB, et enfin la libération des exosomes (Aslan *et al.*, 2019) (**Figure 16**). La formation et la sécrétion des exosomes sont hautement organisées, et un groupe de molécules agit comme un réseau de régulation pour cette voie.

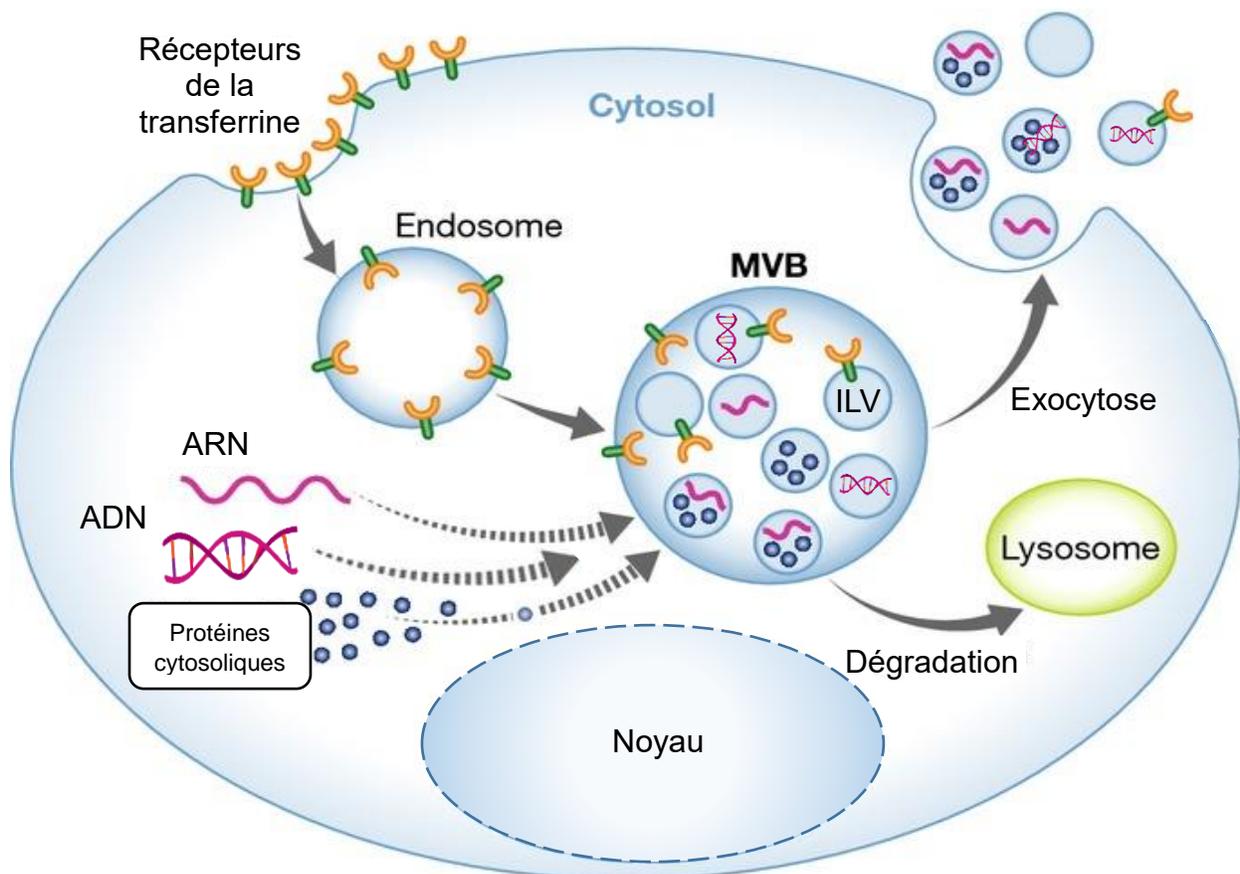


Figure 16. Le processus de la biogenèse et de la sécrétion des exosomes.

MVB: multivesicular bodies ; ILV, intraluminal vesicles. Modifiée d'après (Schorey *et al.*, 2015).

Les exosomes proviennent classiquement de l'invagination de la membrane plasmique pour générer des endosomes précoces (*early endosomes*). La membrane de l'endosome précoce s'invagine à son tour pour produire des vésicules intraluminales (ILV, *intraluminal vesicles*). Les endosomes précoces deviennent alors des endosomes tardifs matures (*mature late endosomes*). Les endosomes tardifs sont généralement appelés MVB puisqu'ils portent les ILV. Au cours de ce processus, les acides nucléiques, les protéines et les lipides sont enfermés dans les ILV (Aslan *et al.*, 2019). D'autre part, le compartiment endosomal peut être dégradé par la fusion des MVB avec le lysosome ou être libéré, sous forme des exosomes, dans l'environnement extracellulaire par la fusion des MVB avec la membrane plasmique (Théry, 2011; Villarroya-Beltri *et al.*, 2016). Les mécanismes moléculaires et les structures cellulaires qui régulent cet équilibre sont mal connus.

Un chargement de molécules est intégré dans les exosomes faisant intervenir soit des mécanismes dépendants du complexe endosomal nécessaire au transport (ESCRT, *endosomal sorting complex required for transport*) soit indépendants de ce complexe (Stuffers *et al.*, 2009; Henne, Stenmark and Emr, 2013) (**Figure 17**).

L'ESCRT est composé des principaux complexes suivants: ESCRT-0, -I, -II et -III. Cette voie, en collaboration avec un certain nombre de protéines, est principalement responsable du transport des récepteurs et des protéines ubiquitinées vers les ILV de MVB, en y impliquant la liaison, le tri, et le regroupement dans l'endosome tardif (Crenshaw *et al.*, 2018). Grâce à la voie dépendante de l'ESCRT, les composants de la machinerie ESCRT sont consécutivement transmis à la membrane endosomale. Lors de leur transport, le substrat Hrs (*hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate*) se lie aux protéines ubiquitaires ESCRT-0, au phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P) et au 3,5-bisphosphate (PI(3,5)P2) à travers des domaines de liaison aux lipides : GLUE (*GRAM-Like Ubiquitin-binding in EAP45*), Fab-1, YGL023, Vps27, et EEA1. ESCRTI et II favorisent le bourgeonnement de l'ILV, et la charge est transportée dans la lumière. La protéine Alix (*ALG-2 interacting protein*) recrute ESCRT-III pour permettre la déformation de la membrane, la structure en spirale et le bourgeonnement complet. Les protéines Vps4 (*vacuolar protein sorting associated protein 4A*) retraitent la machinerie ESCRT. Ensuite, la MVB est transférée vers la membrane plasmique où les ILVs sont libérées dans l'environnement extracellulaire à la suite de leur fusion et sont appelées "exosomes".

Par ailleurs, des mécanismes indépendants de l'ESCRT, tels que la tétraspanine et la sphingomyélinase, peuvent contribuer à la formation des ILV et des MVB (Aslan *et al.*, 2019; Zheng *et al.*, 2019). Les tétraspanines, protéines transmembranaires présentant plusieurs formes, sont impliquées dans la libération des exosomes. Chairoungdua *et al.* ont trouvé que l'expression des tétraspanines CD9 et CD82 augmente la sécrétion exosomale de β -caténine dans les cellules HEK293 (Chairoungdua *et al.*, 2010). De plus, Tspan8 est une autre tétraspanine qui a été liée à la biogenèse des exosomes. L'expression de Tspan8 dans des cellules d'adénocarcinome de rat n'influence pas le pourcentage total des exosomes libérés, mais modifie plutôt leur contenu en ARNm et en protéines (Nazarenko *et al.*, 2010). Récemment, Hurwitz et son équipe ont montré que la tétraspanine CD63 joue également un rôle dans la biogenèse des exosomes (Hurwitz *et al.*, 2016). D'autres études rapportées par les mêmes chercheurs et d'autres ont révélé que les exosomes étaient davantage libérés par les cellules exprimant la protéine membranaire de latence 1 (LMP-1) codée par le virus d'Epstein-Barr que

par les cellules n'exprimant pas cette protéine (Hurwitz *et al.*, 2017; Nkosi *et al.*, 2020). En outre, ils ont démontré que l'expression de LMP-1 impliquait la protéine CD63 pour induire leur incorporation dans des exosomes et la sécrétion de particules (Hurwitz *et al.*, 2017). En revanche, les chercheurs ont signalé l'existence d'une autre voie, dite "voie dépendante des céramides". Cette voie est dérivée de la formation de microdomaines de glycolipoprotéines (radeaux lipidiques) dans lesquels les enzymes sphingomyélinases convertissent la sphingomyéline en céramide (Trajkovic *et al.*, 2008; Stuffers *et al.*, 2009; Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016). En raison de l'agrégation de la céramide, le regroupement des microdomaines est stimulé et la formation d'ILV est initiée dans les MVB (Kalra, Drummen and Mathivanan, 2016).

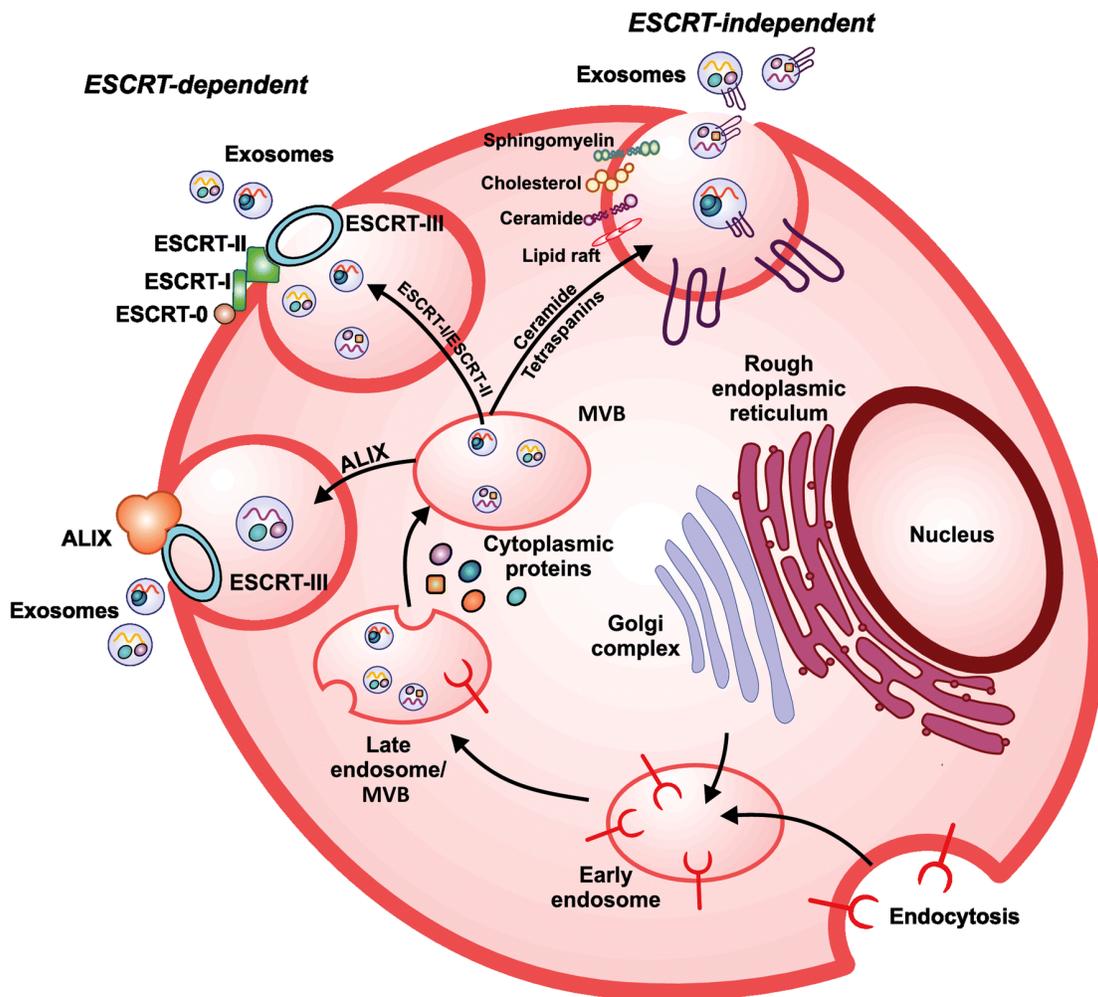


Figure 17. Mécanismes dépendants et indépendants de l'ESCRT.

La formation des exosomes débute par le processus d'endocytose. Il implique un bourgeonnement de la membrane cellulaire vers l'intérieur et regroupe des molécules bioactives, ce qui entraîne la formation de l'endosome. Ces molécules sont ensuite sélectionnées dans des vésicules plus petites qui bourgeonnent de la membrane de l'endosome, formant des corps multivésiculaires (MVB). Les corps multivésiculaires fusionnent soit avec le lysosome pour être dégradés, soit avec la membrane plasmique pour libérer les

exosomes. La formation des exosomes à partir des MVBs se fait par des voies dépendantes et indépendantes de l'ESCRT. Endocytosis : Endocytose ; Early endosome : Endosome précoce ; Late endosome : endosome tardif ; Cytoplasmic proteins : Protéines cytoplasmiques ; Alix : ALG-2 interacting protein X ; MVB (multivesicular bodies) : corps multivésiculaires ; ESCRT (endosomal sorting complex required for transport) : ESCRT-I, -II, et -III ; Lipid raft : Radeau lipidique ; Golgi complex : complexe de Golgi ; Rough endoplasmic reticulum : Réticulum endoplasmique rugueux ; Nucleus : Noyau. D'après (Jadli *et al.*, 2020).

II.2. Mécanismes d'entrée des exosomes libérés dans les cellules réceptrices

Après leur biogenèse et leur libération dans l'espace extracellulaire, les exosomes peuvent être absorbés par les cellules réceptrices selon plusieurs méthodes, dont l'endocytose, l'interaction récepteur-ligand et la fusion membranaire. Ils libèrent alors leur contenu pour avoir un impact sur l'état physiologique ou pathologique de ces cellules réceptrices (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). Le mode d'absorption adopté par un exosome spécifique peut être déterminé par l'interaction entre les protéines transmembranaires et les glycoprotéines situées à la surface des exosomes et la cellule cible (Mulcahy, Pink and Carter, 2014).

Les exosomes doivent tout d'abord entrer en contact avec un récepteur de la membrane plasmique, où ils peuvent rester attachés, être internalisés ou fusionner avec la membrane plasmique (**Figure 18**). Les récepteurs de la membrane plasmique de la cellule réceptrice, tels que les intégrines, peuvent identifier le contenu externe des exosomes et activer des cascades de signalisation au sein de la cellule (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018).

L'interaction avec des récepteurs peut également favoriser l'endocytose des exosomes. Les exosomes sont alors transportés vers les endosomes et, dans de nombreux cas, vers les lysosomes pour leur destruction. Outre l'internalisation médiée par les récepteurs, les exosomes peuvent être endocytés par l'endocytose médiée par la clathrine ou par l'endocytose non spécifique, appelée "endocytose indépendante de la clathrine", comme la micropinocytose et la phagocytose, ainsi que par les radeaux lipidiques ou l'endocytose médiée par les cavéoles (Kuipers *et al.*, 2018). Les exosomes doivent fusionner avec la membrane restreinte de l'endosome ou avec la membrane plasmique réceptrice pour libérer leur contenu intraluminal dans le cytosol des cellules cibles (Kuipers *et al.*, 2018). Certains types de cellules, comme les cellules « HeLa » ou les lignées de cellules B transformées par le virus de l'EBV, produisent des amas d'exosomes en raison de la présence de la protéine tetherin (également connue sous le nom « *bone marrow stromal antigen 2* ») qui attache les vésicules. Ce regroupement pourrait influencer la façon dont ces vésicules sont absorbées, en renforçant la phagocytose ou la macropinocytose pour faciliter l'absorption de ces grandes masses ou de groupes de vésicules extracellulaires (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018).

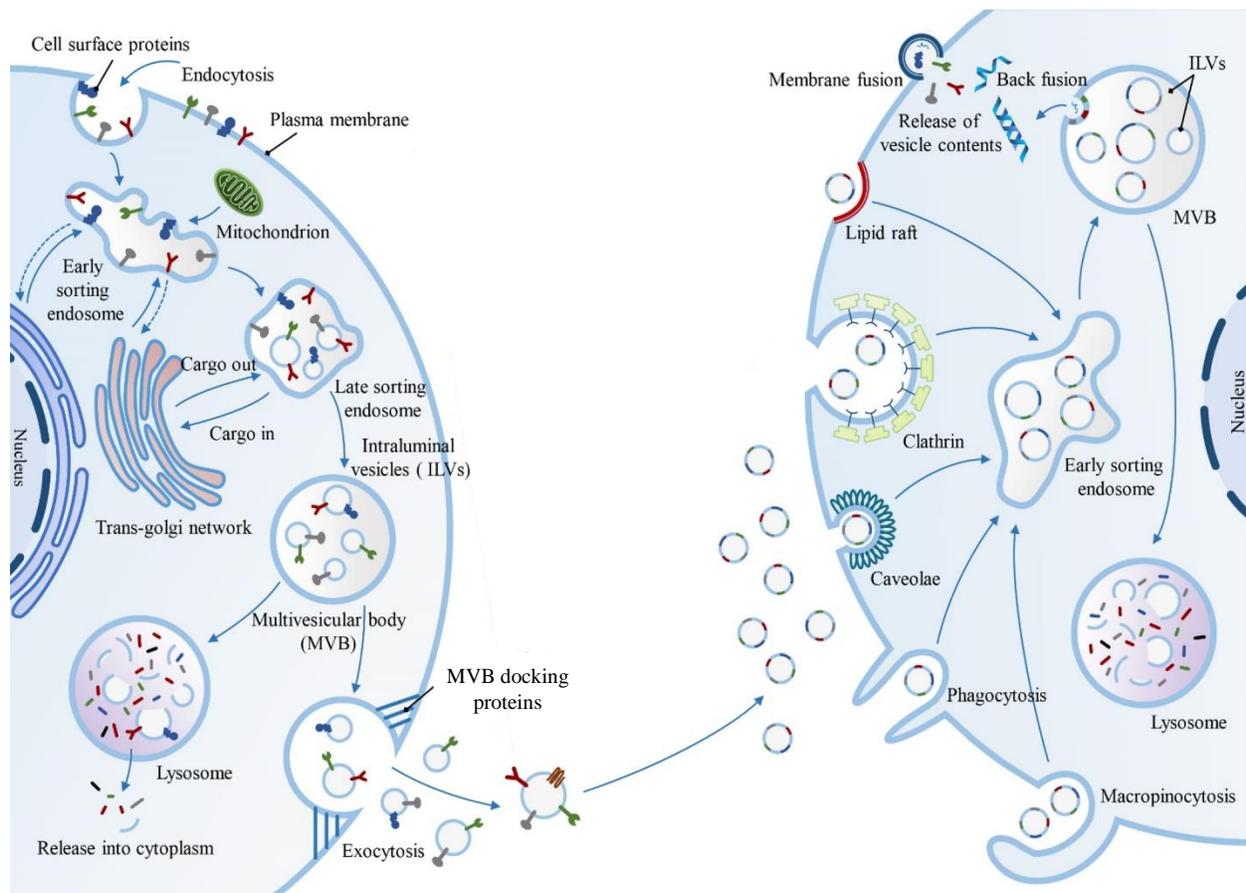


Figure 18. Différents types de mécanismes d'incorporation des exosomes dans les cellules réceptrices.

Plasma membrane : Membrane plasmique ; Endocytosis : Endocytose ; Cell surface proteins : Protéines de surface cellulaire ; Early sorting endosome : Endosome précoce ; Late sorting endosome : endosome tardif ; Intraluminal vesicles (ILVs) : Vésicules intraluminales ; Trans-golgi network : Réseau trans-golgien ; Nucleus : noyau ; Multivesicular body (MVB) : corps multivésiculaires ; Release into cytoplasm : Libération dans le cytoplasme ; MVB docking proteins : Protéines de liaison avec MVB ; Exocytosis : Exocytose ; Macropinocytosis : Macropinocytose ; Phagocytosis : Phagocytose ; Caveolae : cavéoles ; Clathrin : clathrine ; Lipid raft : Radeau lipidique ; Release of vesicle contents : Libération du contenu des vésicules ; Back fusion : Fusion en retour. Modifiée d'après (Zhao *et al.*, 2021).

III. Constitution des exosomes

Les exosomes transportent des protéines, des lipides et divers acides nucléiques (Zhou *et al.*, 2018) (**Figure 19**). Les composants de la charge des exosomes diffèrent en fonction de l'origine des cellules, mais de nombreux composants protéiques sont communs (Théry *et al.*, 2001). La densité des exosomes obtenus par centrifugation en gradient de densité de saccharose varie entre 1,10 et 1,21 g/ml (Li *et al.*, 2017). Il est extrêmement difficile de séparer ces exosomes à l'aide des techniques et instruments actuellement disponibles en raison de la variété de leurs tailles, de leur densité et de leur composition globalement similaire à celle des autres vésicules

extracellulaires. En raison des contraintes technologiques, on ne peut malheureusement déterminer si les divers composants viraux existent simultanément dans un même exosome ou si chaque élément viral est lié à un sous-groupe distinct d'exosomes.

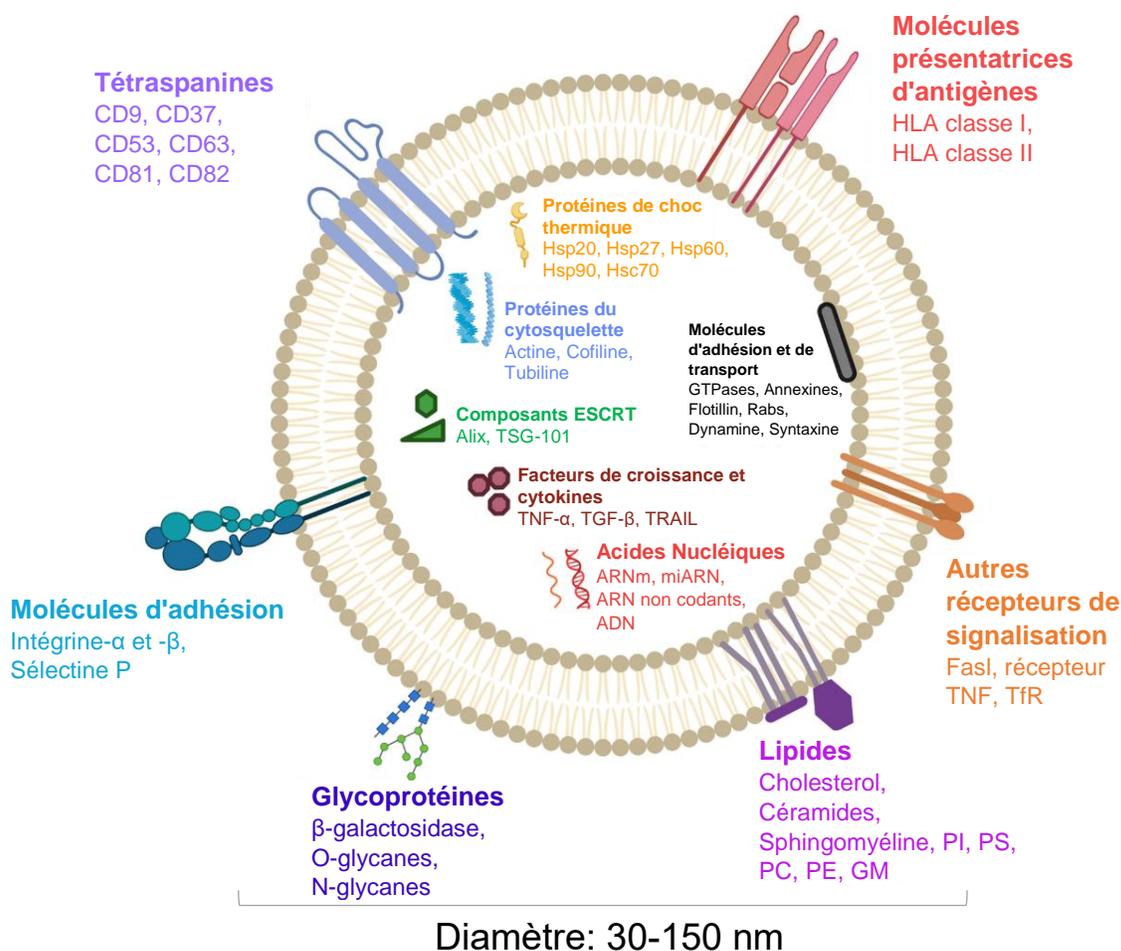


Figure 19. Schéma représentant la structure et la composition des exosomes.

Les exosomes sont constitués de nombreuses protéines : des protéines transmembranaires comme les tétraspansines, les molécules présentatrices d'antigènes, les glycoprotéines et les molécules d'adhésion ; des protéines dans la lumière des exosomes comme les protéines de choc thermique (Hsp, *heat shock proteins*), les protéines du cytosquelette, les composants ESCRT de transport membranaire, les protéines de fusion, les facteurs de croissance et les cytokines. Les exosomes contiennent également de nombreux lipides tels que le cholestérol, les céramides, la sphingomyéline, le phosphatidylinostol (PI), la phosphatidylsérine (PS), la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidyléthanolamine (PE) et les gangliosides (GM), ainsi que des acides nucléiques dont des ARNm, des miARN, des ARN non codants et de l'ADN dans leur lumière; Hsc: Heat shock cognate; TSG: tumor susceptibility gene; TNF: tumor necrosis factor; TGF: Transforming growth factor; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; FasL: Fas ligand; TfR: Transferrin receptor. Modifiée d'après (Gurung *et al.*, 2021).

III.1. Acides nucléiques

Une grande variété d'acides nucléiques sont enveloppés dans les exosomes : de l'ADN mitochondrial, des ADN simple brin, des ADN double brin, des ARN messagers, des ARN antisens naturels, des ARN de transfert, des ARN longs non codants, des micro-ARN et d'autres petits ARN non codants (Zhou *et al.*, 2018; Aslan *et al.*, 2019).

Les miARN et les ARNm ont constitué les premiers groupes d'ARN découverts dans les exosomes. Ensuite, les chercheurs ont révélé la présence de toutes les autres espèces d'ARN dans les exosomes (Aslan *et al.*, 2019). En 2011, de petits fragments d'ADN simple brin ont été reconnus dans les exosomes par Balaj et son équipe (Balaj *et al.*, 2011). Plus tard, Kahlert et al. y ont découvert de grands fragments d'ADN génomique double brin (Kahlert *et al.*, 2014).

Les cellules tumorales infectées par l'EBV libèrent des exosomes contenant différents types de produits viraux et au moins trois groupes d'acides nucléiques, tels que les EBER, les miARN et les ARNm (Zheng *et al.*, 2019). Les EBER sont largement exprimés dans presque toutes les cellules infectées par l'EBV en phase de latence et dans les exosomes qui en sont dérivés. Les EBER comprennent deux types, EBER-1 et EBER-2. Une forte prédominance d'EBER-1 est observée dans les exosomes, due à la forte expression d'EBER-1 dans les mêmes cellules hôtes (Aromseree *et al.*, 2017). Selon Ahmed et al, les EBER-1 et EBER-2 ont été trouvés dans les exosomes isolés des lignées cellulaires infectées par l'EBV (Ahmed *et al.*, 2014). Le chercheur Iwakiri a également trouvé des EBER dans des exosomes isolés à partir du sérum de patients atteints de NPC (Iwakiri, 2016). Les EBER pourraient exister dans les exosomes sous la forme d'un complexe ARN-protéine (complexe EBER-La) (Ahmed *et al.*, 2014).

Les exosomes transportent également des miARN codés par l'EBV. Selon Pegtel, les formes matures des miARN BART et BHRF1 de l'EBV sont particulièrement accumulées dans les exosomes libérés par les LCL infectées par l'EBV (Pegtel, van de Garde and Middeldorp, 2011). Les cellules dendritiques en co-culture peuvent absorber des miARN viraux transportés dans les exosomes sécrétés par les LCL, tels que miR-BHRF1-3, miR-BART1-5p, miR-BART2-5p et miR-BART3 (Pegtel *et al.*, 2010). En outre, Higuchi et al. ont découvert que les miARN BART sont transportés dans les exosomes sécrétés par les cellules de lymphome de Burkitt infectées par l'EBV (Higuchi *et al.*, 2018). Dans d'autres études, les chercheurs ont également détecté, *in vivo*, des miARN BART exosomaux purifiés à partir du sérum de patients atteints de NPC, comme de souris transplantées avec NPC, sans les miARN BHRF1 exosomaux. Plus sélectivement, ils ont détecté dans les exosomes libérés par des cellules de NPC infectées par l'EBV *in vitro*, les miR-BART-1, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13 et 16 (Meckes *et al.*, 2010; Ramayanti *et al.*, 2019).

En parallèle, les exosomes dérivés des cellules tumorales infectées par l'EBV peuvent incorporer des ARNm codant des protéines de latence de l'EBV comme LMP1, LMP2, EBNA-1 et EBNA-2. Ces ARNm peuvent restaurer leurs fonctions après leur libération dans les cellules réceptrices et être traduits en protéines (Roma-Rodrigues, Fernandes and Baptista, 2014).

III.2. Lipides et Protéines

Les contenus lipidiques et protéiques ont été largement étudiés à l'aide de techniques telles que le western-blot, le tri cellulaire activé par fluorescence (*fluorescence-activated cell sorting*, également connu sous le nom de tri cellulaire par cytométrie de flux, ou plus couramment sous l'acronyme FACS), la spectrométrie de masse et la microscopie immuno-électronique (Théry *et al.*, 2001; Nkosi *et al.*, 2020).

Les lipides sont des facteurs cruciaux de leur membrane. Les exosomes sont enveloppés par une bicouche lipidique, suite à la biogenèse endosomale (Ramachandran and Palanisamy, 2012). Le cholestérol, la sphingomyéline, les hexosylcéramides, la phosphatidylsérine, l'acide lysobisphosphatidique, la céramide et les acides gras saturés constituent le profil lipidique des exosomes libérés, qui sont tous homologues à la membrane plasmique des cellules productrices (Aslan *et al.*, 2019).

D'autre part, les exosomes transportent de nombreuses protéines appartenant à la famille des tétraspanines (CD9, CD63, CD81 et CD82), des composants du complexe ESCRT (TSG101, Alix), des protéines de choc thermique (Hsp 60, Hsp70 et Hsp90) et des enzymes (GAPDH, ATPase et pgk1) (Schorey and Bhatnagar, 2008; Aslan *et al.*, 2019). En outre, ils transportent des protéines spécifiques en fonction du type cellulaire, comme le facteur de von Willebrand ou CD41a (GPIIb, *platelet glycoprotein IIb*) sur les plaquettes, le CMH de classe II et les molécules costimulatrices (CD86) sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), le récepteur TCR (*T-cell receptor*) sur les exosomes dérivés des cellules T et la perforine ou le granzyme sur ceux dérivés de lymphocytes T cytotoxiques (Caby *et al.*, 2005; Schorey and Bhatnagar, 2008).

En outre, les cellules infectées par un virus peuvent sécréter des exosomes comprenant des protéines virales spécifiques, comme dans les exosomes dérivés de cellules cancéreuses infectées par le virus EBV. Par exemple, les exosomes sécrétés par les cellules de carcinome nasopharyngé humain (NPC-Exo) peuvent contenir la protéine virale LMP-1, qui joue un rôle important dans la lymphomagenèse (Zhou *et al.*, 2018; Nkosi *et al.*, 2020). Selon Vazirabadi, LMP-1 a été trouvée de la manière dans les exosomes générés par les LCL EBV-positives (Vazirabadi *et al.*, 2003). Le chercheur Mrad a également démontré, en utilisant la cytométrie de flux, que les protéines LMP-2A et EBNA-1 peuvent être trouvées dans les exosomes du sérum de patients infectés par l'EBV et atteints de sclérose en plaques (SEP), ainsi que la protéine LMP-1 (Mrad *et al.*, 2021).

IV. Fonctions des exosomes liés à l'EBV dans les cellules cibles

Les vésicules extracellulaires, comme les exosomes, une fois libérées dans l'environnement extracellulaire, peuvent atteindre les cellules cibles et y transférer leur contenu pour déclencher des réponses fonctionnelles et induire des changements phénotypiques qui influencent l'état physio-pathologique (van Niel, D'Angelo and Raposo, 2018). L'absorption des exosomes peut influencer le métabolisme des cellules, la prolifération cellulaire, la réponse

immunitaire, l'angiogenèse, la migration et le développement des métastases et modifier le microenvironnement tumoral. En outre, il a été proposé que les virus, notamment l'EBV et d'autres herpèsvirus, exercent une pression positive sur la libération des exosomes par les cellules infectées.

De nombreuses recherches ont indiqué que les exosomes jouent un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'invasion et les métastases de nombreuses tumeurs malignes. Les exosomes reprogramment l'expression génétique de la cellule réceptrice, ce qui aboutit à un caractère métastatique (Fan *et al.*, 2018; Qadir *et al.*, 2018; Aslan *et al.*, 2019). Il a aussi été démontré que l'EBV modifie la composition et le contenu protéique des exosomes générés à partir de cellules B infectées en phase de latence, avec des modifications notables associées à l'expression de LMP-1. De façon remarquable, LMP-1 a également été montrée induire l'expression des microARN et des ARNm présents dans les exosomes, ce qui pourrait affecter la fonction des exosomes sur les cellules réceptrices (Meckes *et al.*, 2013). En 2000, Dukers a décrit pour la première fois la présence de LMP-1 dans un exosome (Dukers *et al.*, 2000). LMP-1 est l'oncogène le plus commun, qui est exprimé dans la majorité des malignités associées à l'EBV. La protéine cellulaire LMP-1 favorise la sécrétion des exosomes, et les exosomes modifiés par LMP-1 peuvent déclencher de nombreuses cascades de signalisation en aval dans les cellules réceptrices, faisant intervenir NF- κ B, MAPK/ERK, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR, *epidermal growth factor receptor*) et PI3K/AKT par l'interaction de facteurs associés au récepteur du facteur de nécrose tumorale (TRAF) et d'autres molécules effectrices se liant aux CTAR. Ces voies sont reconnues pour établir l'angiogenèse, la migration et l'invasion (Nkosi *et al.*, 2020). Les exosomes contenant LMP-1, par l'intermédiaire de CTAR1, induisent des transitions épithélio-mésenchymateuses (TEM) et leurs caractéristiques associées au cancer et aux métastase avec une signalisation MAPK/ERK médiée par les intégrines qui peut sous-exprimer la E-cadhérine et surexprimer la N-cadhérine. De plus, il a été démontré que l'expression de LMP-1 augmente la collagénase de type IV, la métalloprotéinase matricielle 9 (MMP9) et la MMP1 dans les cellules réceptrices, qui sont impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. De même, l'expression de LMP-1 contenue dans les exosomes stimule l'expression du facteur 1 inductible par l'hypoxie (HIF1, *Hypoxia-inducible factor-1*), du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR, *Epithelial Growth Factor Receptor*) et du facteur de croissance des fibroblastes (FGF-2, *fibroblast growth factor*). Plus tard, il a été révélé que les LMP-1 exosomales augmentent l'adhésion cellulaire *via* l'intégrine-5 (Nkosi *et al.*, 2020). Dans l'ensemble, ces résultats commencent à fournir des explications sur les processus utilisés par les vésicules extracellulaires modifiées par LMP-1 pour augmenter l'expression des protéines de la matrice extracellulaire dans les cellules réceptrices afin de remodeler le microenvironnement tumoral.

LMP-2A est une protéine virale également identifiée dans les exosomes associés à l'EBV. La fonction biologique de la protéine exosomale LMP-2A n'est pas claire. Les chercheurs ont suggéré que LMP-2A exosomale pourrait imiter la signalisation du récepteur des cellules B (BCR) et agir comme un vecteur de la latence virale et de la pathogenèse, comme au niveau cellulaire. Dans le carcinome nasopharyngé, LMP-2A transportée par les exosomes peut avoir, par contact avec LMP-1, un rôle important sur la prolifération cellulaire, la migration et la tumorigénicité ; la combinaison de LMP-1 et de LMP-2A active la cascade PI3K/AKT et induit la dégradation de p53

et l'expression de c-Myc, ce qui entraîne une prolifération cellulaire et un fort pouvoir métastatique dans le cancer du nasopharynx. En revanche, la présence de LMP-2A seule inhibe ces activités (Zhou *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2019).

Comme LMP-1 et LMP-2A, l'expression d'EBNA-1 peut également réguler la fonction des exosomes liés à l'EBV. La protéine EBNA-1 exosomale augmente le stress de réplication de l'ADN et l'instabilité génomique en favorisant la division des cellules promyélocytaire (PML-NB, *Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies*). En outre, elle peut collaborer avec la protéase USP7 pour inhiber la régulation négative de p53. L'expression anormale de la protéine EBNA-1 dans la lignée cellulaire du carcinome nasopharyngé CNE réduit l'expression des marqueurs épithéliaux alors qu'elle augmente l'expression des marqueurs des cellules mésenchymateuses, provoquant une TEM. Les polymorphismes de la protéine EBNA-1 peuvent constituer un facteur de risque d'angiogenèse (Zhou *et al.*, 2018). Par exemple, dans la lignée cellulaire SUNE-1 de NPC, Dheekollu *et al.* ont démontré que la variante d'EBNA-1 était moins efficace dans le maintien de l'épisome, qui est mécaniquement lié à la structure de la chromatine et aux changements épigénétiques, qui soutiennent la transmission chromosomique virale pendant la mitose et l'expression du gène viral (Dheekollu *et al.*, 2017). Par ailleurs, la protéine EBNA-1 exosomale peut travailler en coordination avec les oncogènes viraux et cellulaires pour contrôler le développement des cellules infectées par l'EBV (Raab-Traub, 2015). De plus, elle peut empêcher la production des miR-200a et miR-200b cellulaires dans le NPC, augmentant ainsi la TEM et la résistance à la thérapie (Wang *et al.*, 2014).

Dans plusieurs tumeurs malignes, le transport des ARN non codants chargés dans les exosomes est également critique pour la communication entre les cellules. De multiples études ont indiqué que des ARN non codants, y compris des miARN et des ARN longs non codants (ARNlnc), peuvent être présents dans les exosomes et moduler la croissance des cellules tumorales par différentes voies (Fan *et al.*, 2018). Les exosomes contiennent également des ARN non codants de l'EBV, notamment des EBER et des miARN de l'EBV (Zhou *et al.*, 2018).

Les EBER exosomaux peuvent inhiber l'apoptose dans les cellules EBV-négatives et favoriser la croissance et la division cellulaires *via* la signalisation de l'IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) (Zhou *et al.*, 2018). Les EBER-1 exosomaux peuvent activer les gènes liés à l'interféron (IFN) et l'interleukine-6 (IL-6) de manière dépendante du type de cellule. Cependant, les caractéristiques biologiques de ces EBER exosomaux et leurs fonctions dans le cycle viral sont peu connues (Zhao *et al.*, 2019).

Les miARN codés par l'EBV sont divisés en deux groupes distincts : la région BHRF1 et la région BART. Higuchi et son équipe ont démontré que les miARN BART de l'EBV sont incorporés dans les exosomes produits par les cellules du BL infectées par l'EBV. Les miARN BARTs exosomaux peuvent induire une régulation immunologique du phénotype des macrophages en augmentant la production du facteur de nécrose tumorale α (TNF- α , *tumor necrosis factor α*) et de l'interleukine 10 (IL10), ainsi qu'en augmentant la survie cellulaire. De plus, leurs découvertes, *in vitro* et *in vivo*, soulignent l'importance du rôle des miARN BART exosomaux dans la formation d'un environnement inflammatoire pro-tumoral associé aux macrophages et dans l'accélération de l'établissement du lymphome (Higuchi *et al.*, 2018). Par ailleurs, les miARN BART de l'EBV libérés *via* les exosomes présents dans le NPC ciblent la

principale protéine suppresseur de tumeur, la PTEN (*phosphatase and tensin homologue*) afin d'activer la TEM. Il a été démontré que le miR-BART1 exosomal de l'EBV augmente le taux de F-actine et provoque le réarrangement du cytosquelette d'actine dans les cellules du NPC en stimulant les voies dépendantes de la PTEN, notamment les voies FAK-p130^{Cas} et Shc-MEK-ERK1/2, ce qui entraîne la TEM et la résistance au traitement (Cai *et al.*, 2015). En outre, lors d'une infection par le virus de l'EBV, le miR-BART-10-3p exosomal peut stimuler l'invasion et les métastases en induisant la TEM des cellules NPC (Yan *et al.*, 2015). De même, les miR-BART exosomaux régulent les gènes apoptotiques, notamment PUMA, Bim et TOMM22. Ces EBER et miARN exosomaux sont impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire ainsi que dans le développement et l'évolution du NPC (Zhou *et al.*, 2018).

D'autre part, les ARNlnc cellulaires peuvent être transférés par les exosomes aux cellules réceptrices. Il a été démontré que les ARNlnc exosomaux jouent un rôle sophistiqué dans la modulation de l'expression des gènes à plusieurs niveaux, influençant la prolifération cellulaire, les métastases et la stabilité génomique (Zhang *et al.*, 2020). Bien que les ARNlnc exosomaux aient été signalés dans les cellules cibles et libérés par les cellules tumorales infectées par l'EBV (Gallo *et al.*, 2017), la présence d'ARNlnc codés par l'EBV (ARNlnc BART et BHRF1) dans les exosomes et leurs fonctions dans la lymphoprolifération n'ont pas été explorées jusqu'à ce jour.

Chapitre II : Objectifs du travail

Chapitre II : Objectifs du travail

Dès sa découverte en 1964, l'EBV fut le premier virus pour lequel un pouvoir oncogène fut reconnu, du fait de son aptitude à transformer les lymphocytes B *in vitro*, et de sa présence dans les cellules tumorales de la quasi-totalité des cas de lymphome de Burkitt endémique. Par la suite, l'EBV a été trouvé associé à un ensemble extrêmement varié de pathologies malignes et il peut être aujourd'hui considéré comme le premier modèle de virus oncogène humain.

L'EBV est présent dans plus de 90% des cas de LAI où il est localisé fréquemment dans les grands blastes B répartis dans les tissus et beaucoup plus rarement dans les lymphocytes T néoplasiques. Les avis sur le rôle du virus dans le LAI sont controversés. Certains chercheurs considèrent qu'une réactivation virale surviendrait de manière secondaire à une immunodépression induite par la maladie, favorisant ainsi l'expansion des lymphocytes T_{FH} et des cellules B, et jouant un rôle dans le développement du microenvironnement tumoral. D'autres avancent que le virus lui-même serait à l'origine du LAI en activant les lymphocytes T_{FH}. La présence de cellules EBV positives très précocement dans la maladie d'une part, et le fait que des proliférations B puissent survenir au décours du LAI d'autre part, laissent penser que l'EBV pourrait jouer un rôle dans le développement du LAI.

Cependant, on peut noter que peu de recherches ont été réalisées dans ce domaine. Notre laboratoire travaille depuis plusieurs années sur ce sujet, et s'est intéressé à caractériser les souches d'EBV présentes dans les biopsies de patients atteints de LAI, par séquençage complet du génome viral par NGS. Il a ainsi été montré que deux souches virales étaient principalement trouvées dans les LAI, l'une d'entre elles étant associée de manière significative à une faible survie post-diagnostic. De manière intéressante, le même travail a révélé que l'EBV était toujours présent sous forme clonale dans les biopsies, montrant que l'infection survient avant la transformation. De plus, le virus a été constamment trouvé sous forme latente dans les mêmes biopsies. L'ensemble de ces résultats laisse penser que l'EBV pourrait être impliqué dans cette pathologie (Bahri *et al.*, 2022).

Dans ce contexte et pour compléter ce travail sur l'EBV dans le LAI, il était important d'étudier le transcriptome viral par la technologie de NGS, afin de déterminer quels gènes sont exprimés et de prédire ainsi les interrelations virus-cellule. Ceci constitue la première partie de notre travail, qui a été effectuée d'une part sur des lignées dont l'expression des gènes de latence était déjà décrite et permettait de valider notre approche, et d'autre part sur des biopsies de patients, afin de comprendre comment le virus peut participer activement à la pathologie.

Par ailleurs, il a été montré que les transcrits et les protéines de l'EBV peuvent être sécrétés par les exosomes des cellules hôtes infectées. La principale fonction des exosomes est de promouvoir la communication intercellulaire. Sous l'angle de la pathologie lymphomateuse, on peut considérer que ces exosomes, emportant des informations virales de cellules transformées infectées vers des cellules naïves, peuvent provoquer le développement et la dissémination de la tumeur (Zhou *et al.*, 2018).

Pour aller plus loin dans notre travail, en nous appuyant sur le fait que les cellules transformées et infectées fabriquent des exosomes, il nous a paru important d'étudier le contenu de ces exosomes en transcrits viraux, messagers emportés vers d'autres cellules. Ceci constitue la deuxième partie de notre travail. Dans cette deuxième partie, la même technique de capture et les mêmes lignées cellulaires qui avaient initialement servi pour la première partie du travail, ont été utilisées pour les exosomes. L'objectif principal était de voir parmi les transcrits exprimés dans la cellule quels sont ceux qui se retrouvent dans les exosomes et donc de comprendre s'il existe une sélection.

L'objectif ultime de ce travail était d'appliquer cette approche à des plasmas humains de patients atteints de LAI, afin de voir si les transcrits viraux présents dans les exosomes sont les mêmes dans tous les cas de LAI, s'ils diffèrent d'autres pathologies, s'ils varient au cours du temps, s'ils évoluent sous traitement, s'il est possible de corréler cette évolution à un pronostic. Nous n'avons malheureusement pas pu avancer suffisamment cette dernière partie du travail pour pouvoir présenter des résultats.

Globalement, l'étude que nous réalisons sera donc intéressante pour comprendre le mécanisme qu'utilise ce virus pour lutter contre le système immunitaire dans le développement et la dissémination de la maladie.

Chapitre III : Publications

Article 1 : Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas

L'EBV est un gamma-herpès virus humain ubiquitaire qui infecte la majorité de la population. La latence est une caractéristique notable des herpèsvirus, et bien sûr de l'EBV, qui est capable de maintenir son génome dans les cellules hôtes pendant une durée prolongée en l'absence de production de virions. L'EBV est lié au développement d'une variété de carcinomes et de lymphomes B ou T. Neuf protéines (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP et LMP-1, -2A, -2B) ainsi que deux ARN (EBER, et BART) et des miARN sont exprimés pendant la latence et pourraient jouer un rôle fondamental dans la prolifération cellulaire. Son association avec plusieurs tumeurs malignes fait de l'EBV l'un des virus oncogènes les plus importants.

Par exemple, l'EBV est trouvé dans plus de 90 % des cas de LAI, la forme la plus courante de lymphome périphérique à cellules T. Le LAI touche principalement les personnes âgées, et c'est un lymphome agressif de mauvais pronostic. Ce lymphome, malgré sa rareté, est plus fréquent en Europe que dans les autres régions du monde.

Les recherches sur la relation entre l'EBV et le LAI sont limitées et il est encore difficile de savoir si le virus joue un rôle dans cette pathologie. Notre laboratoire a déjà étudié la séquence complète du génome de l'EBV chez des patients atteints de LAI. Il a été montré que l'EBV était présent sous une forme clonale dans le LAI, alors que les cellules B étaient plutôt polyclonales dans la majorité des cas. De plus, le profil de mutation observé était similaire à celui d'autres lymphomes positifs pour l'EBV, en particulier dans les épitopes cibles des lymphocytes. Ces mutations pourraient donc avoir une importance dans la stratégie d'échappement du virus au système immunitaire dans cet environnement pluricellulaire complexe. De même, le virus était de façon quasi-constante sous forme latente.

Les mutations au niveau des gènes peuvent altérer l'expression du transcrits qui peut à son tour modifier la structure des protéines ainsi que leur expression et leurs fonctions. En se basant sur cette théorie, ces résultats intéressants sur les caractéristiques de l'EBV dans le LAI, comprenant les mutations présentées dans les séquences d'ADN génomiques de l'EBV chez les patients souffrants de LAI, nous ont incité à analyser le transcriptome de l'EBV dans les biopsies de LAI et à les comparer à d'autres lymphomes et à des lignées cellulaires positifs pour l'EBV par RNA-seq. Nous avons aussi comparé nos résultats à ceux déjà publiés de notre laboratoire en ce qui concerne la séquence complète du génome de l'EBV, afin de voir si ces mutations perturbent le fonctionnement de l'EBV et son implication dans cette pathologie.

Notre travail a porté sur les biopsies de 35 patients atteints de lymphomes dont 14 de LAI et le reste de différents lymphomes B et T. Il a aussi porté sur plusieurs lignées cellulaires : 7 lignées connues, B95.8, 4 BL (Jijoye, Raji, Namalwa, et P3HR1) et 2 NK/TL (Mec04 and SNK6), et 4 lignées LCL établies au laboratoire (COAN, DPL, Kreb2, and MLEB2).

Dans notre travail, nous avons utilisé la technique de séquençage à haut débit. Cette technique ou séquençage de nouvelle génération (NGS), a été introduite en 2005. Elle est également appelée séquençage massif et parallèle car elle est basée sur la génération et la lecture en parallèle de millions de petites séquences d'ADN ou d'ARN indépendantes de taille

d'environ 300 pb. Les données brutes obtenues sont ensuite organisées par traitement informatique pour reconstituer le brin d'ADN cible, avant d'être analysées pour détecter d'éventuelles variations par rapport à la séquence de référence.

Cette technologie est actuellement la technique de biologie moléculaire la plus développée. Elle permet de préciser l'ordre des nucléotides dans la séquence d'ADN ou d'ARN étudiée, en synthétisant leur ADN complémentaire dans les délais les plus courts et à un coût acceptable. Elle permet de réaliser un séquençage massif en parallèle grâce à une méthode unique qui détecte les bases individuelles pendant leur incorporation dans les brins d'ADN en formation. En plus, elle a pu évoluer grâce à l'augmentation de la puissance de calcul, au développement de capteurs optiques à très haute résolution et à l'amélioration des algorithmes de traitement d'images.

Le séquençage de l'ARN (RNA-seq) a pour but de détecter et de quantifier les transcrits exprimés dans un échantillon. Son utilisation comprend la recherche de nouveaux transcrits et les études de la différence d'expression et de l'épissage alternatif. La technique RNA-seq présente des avantages par rapport aux analyses d'expression génique par micropuces, étant donné qu'elle permet une évaluation sans erreur de l'ensemble des transcrits avec une gamme dynamique plus vaste. De nombreuses données RNA-seq ont été enregistrées dans différents types de cellules et de tissus, dans des conditions diverses, mais peu de recommandations claires sur le nombre de lectures requis ont été publiées. En effet, les critères de séquençage varient souvent en fonction de la problématique biologique étudiée, de même que de la longueur et de la profondeur du transcriptome analysé.

Dans notre cas, l'ARN total a été extrait puis les transcrits (ARNm poly-A) ont été capturés par des billes oligo(dT). Ensuite, l'enrichissement des transcrits spécifiques de l'EBV a été réalisé par capture à l'aide de sondes spécifiques, selon un protocole comprenant plusieurs étapes : fragmentation enzymatique, synthèse des 1^{er} et 2^e brins d'ADN, ligation à des adaptateurs, hybridation à des sondes spécifiques de l'EBV (EBV-1 et EBV-2) puis capture des transcrits spécifiques de l'EBV par des billes couplées à la streptavidine. Les librairies finales ont ensuite été séquencées par NGS à l'aide d'un séquenceur MiSeq Illumina (15 gigaoctets de données avec 25 millions de lectures).

Le système MiSeq intègre la formation de clusters, l'amplification, le séquençage et le traitement des données dans un même instrument. Cette méthode utilise des terminateurs dNTP, permet de détecter les bases individuelles dans la séquence étudiée au moment où elles sont incorporées dans les brins d'ADN massives et parallèles. Des colorants fluorescents sont ensuite visualisés lorsque chaque dNTP est ajouté, puis dissocié afin de laisser la place à la base suivante. Grâce à la présence des 4 dNTP réversibles, la compétition naturelle minimise le problème d'incorporation. Les sélections de bases sont réalisées directement en fonction des mesures d'intensité des signaux pendant chaque cycle.

Les résultats bruts obtenus après séquençage ont été bioanalysés ultérieurement. Dans l'analyse bioinformatique, les lectures qualifiées correspondant à la référence humaine ont été retirées, et celles correspondant à la référence du génome de l'EBV ont été comptées et

normalisées en calculant les transcrits par million (TPM) afin de mettre en évidence une différence d'expression. Cette différence a ainsi été visualisée sous la forme d'une carte de chaleur.

D'une manière satisfaisante, le virus de l'EBV a présenté une expression significative des transcrits BART chez les LAI supérieure à celle observée chez les autres lymphomes. Par ailleurs, les LAI étaient en phase de latence IIc et ils avaient une forte expression de *BNLF2a* et *BCRF1*. En outre, la comparaison des résultats obtenus pour nos patients à ceux obtenus pour les lignées cellulaires a montré que le profil viral ne semblait pas être particulier à un type de pathologie. Ces résultats permettent de supposer que le virus de l'EBV est responsable du développement du LAI comme d'autres lymphomes.

Article

Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas

Nader Bayda ^{1,2}, Valentin Tilloy ³, Alain Chaunavel ⁴, Racha Bahri ¹, Mohamad Adnan Halabi ¹, Jean Feuillard ⁵, Arnaud Jaccard ⁶ and Sylvie Ranger-Rogez ^{1,7,*}

- ¹ Microbiology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Faculty of Pharmacy, 87025 Limoges, France; nader.bayda@unilim.fr (N.B.); racha_bahri91@outlook.com (R.B.); adnan.halaby@gmail.com (M.A.H.)
 - ² Department of Infectious Disease Control, Faculty of Public Health, Jinan University, Tripoli 1300, Lebanon
 - ³ National Reference Center for Herpesviruses, Bioinformatics, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France; valentin.tilloy@unilim.fr
 - ⁴ Pathology Department, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France; alain.chaunavel@chu-limoges.fr
 - ⁵ Biological Hematology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France; jean.feuilleard@unilim.fr
 - ⁶ Clinical Hematology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, University Hospital Dupuytren, 87042 Limoges, France; arnaud.jaccard@unilim.fr
 - ⁷ Virology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France
- * Correspondence: sylvie.rogez@unilim.fr



Citation: Bayda, N.; Tilloy, V.; Chaunavel, A.; Bahri, R.; Halabi, M.A.; Feuillard, J.; Jaccard, A.; Ranger-Rogez, S. Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas. *Cancers* **2021**, *13*, 610. <https://doi.org/10.3390/cancers13040610>

Academic Editors:
Rosita Accardi-Gheit,
Lorenzo Leoncini and Lucia Mundo
Received: 4 January 2021
Accepted: 28 January 2021
Published: 4 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Simple Summary: Angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL) is probably the most common peripheral T-cell lymphoma. This pathology, although rare, is more common in Europe than in other regions. This lymphoma has a poor prognosis. AITL is very commonly associated with the Epstein-Barr virus (EBV) although the virus is not often found in neoplastic T cells but rather in adjacent B cells. Our objective was to study the transcriptome of EBV in AITLs comparatively to other EBV-associated lymphomas and to compare the results with those obtained for cell lines. We showed in AITLs a strong expression of Bam-HI A rightward transcripts (BARTs) more expressed than in the other lymphomas and especially than in cell lines. BARTs can participate in tumor development. We also showed a latency IIc in AITLs with the expression of *BNLF2a* and *BCRF1* genes which may participate in the survival of infected cells. These results support the involvement of EBV in AITLs.

Abstract: The Epstein-Barr virus (EBV) is associated with angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL) in more than 80% of cases. Few studies have focused on this association and it is not clear now what role the virus plays in this pathology. We used next-generation sequencing (NGS) to study EBV transcriptome in 14 AITLs compared to 21 other lymphoma samples and 11 cell lines including 4 lymphoblastoid cell lines (LCLs). Viral transcripts were recovered using capture probes and sequencing was performed on Illumina. Bam-HI A rightward transcripts (BARTs) were the most latency transcripts expressed in AITLs, suggesting they may play a role in this pathology. Thus, BARTs, already described as highly expressed in carcinoma cells, are also very present in AITLs and other lymphomas. They were poorly expressed in cell lines other than LCLs. AITLs showed a latency IIc, with *BNLF2a* gene expression. For most AITLs, *BCRF1*, which encodes a homologous protein of human interleukin 10, vIL-10, was in addition expressed. This co-expression can contribute to immune escape and survival of infected cells. Considering these results, it can be assumed that EBV plays a pathogenic role in AITLs.

Keywords: transcriptome; transcripts; Epstein-Barr virus; EBV; angioimmunoblastic T cell lymphoma; AITL; lymphoma; next-generation sequencing; NGS

1. Introduction

The Epstein–Barr virus (EBV) is a widespread human gamma-herpesvirus of which two types can be distinguished, EBV type 1 (EBV-1) and EBV type 2 (EBV-2), according to geographic distribution, virulence, and differences in the latent genes (principally *Epstein–Barr nuclear antigen-2 (EBNA-2)*, *-3A*, and *-3C* genes) [1]. EBV prevalence is very high and almost all adults have been infected [2]. As with all herpesviruses, the primary infection is followed by a lifelong latency defined by the absence of production of new infectious virions. In the event of infected cell activation, episodes of viral reactivation may occur, corresponding to a resumption of the lytic cycle with the production of infectious virus [3].

First resting B-cell EBV infection leads to expression of the Epstein–Barr nuclear antigen-2 (EBNA-2) and EBNA-Leader Protein (EBNA-LP) proteins as well as latent BHRF1, a bcl2 homolog protein, driven by the activated viral promoter Wp [4]. The upstream viral promoter Cp is then activated by both expressed EBNAs and the cellular factor recombination signal binding protein for the immunoglobulin Kappa J region (RBP-Jκ), leading to the production of the six EBNA proteins, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, -3B, -3C, and EBNA-LP. The Wp promoter is gradually hypermethylated and transcription passes under Cp control [5]. At the same time, the latent membrane proteins LMP-1, LMP-2A, and LMP-2B are produced following the activation of their promoters. *Bam*-HI A rightward transcripts (BARTs) and non-coding RNAs, Epstein–Barr virus-encoded small RNAs (EBERs), are also transcribed, plus a set of miRNAs. This latency pattern, defined as latency III (Lat III), drives B cell growth transformation resulting in the establishment of permanent in vitro lymphoblastoid cell lines (LCLs). Lat III is found in immunocompromised lymphomas.

Other latency patterns have also been described in which the latency gene expression is more restricted [6–8]. Latency 0 (Lat 0), characterized by the presence of EBER, BART, miRNAs, and possibly LMP-2A transcripts, in the absence of any other EBV protein, is found in resting recirculating memory B cells of healthy subjects. Latency I (Lat I), identified in Burkitt’s lymphoma (BL) biopsies and in lines derived from BL, is characterized by the expression of a single viral protein, EBNA-1, and the production of non-coding RNAs. In this form of latency, the Wp and Cp promoters are inactive and the production of the EBNA-1 protein is solely dependent on the alternative viral promoter Qp. Lat I is also observed during cell division in memory B cells. In latency II (Lat II), activation of the Qp promoter also results in the production of EBNA-1, but at the same time, LMP-1, LMP-2A, and LMP-2B are also expressed as the EBERs, BARTs, and miRNAs. Lat II is described in NK/T lymphoma (NK/TL), Hodgkin’s lymphoma (HL), and nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumors [9]. Only a small number of viral genes are therefore involved in any latency. These different forms of latency have thus been well characterized in B lymphocytes, but a continuum likely exists in vivo between these different models, and it was suggested that expression of latency proteins varies with cell differentiation [10]. Recent studies have reported a brief period after infection and before cell division during which there is a transient explosion of lytic gene expression, without viral replication, and concomitantly with the expression of the first latent genes from the Wp promoter [10–13]. This latency phase, characterized by the presence of EBNA-2 in the absence of LMP-1, was named the pre-latent phase or “latency IIb”. It differs from latency IIa which follows latency III and is defined by the presence of LMP-1 in the absence of EBNA-2. Furthermore, it is known that EBV can also establish a latent infection of epithelial cells or NK/T lymphocytes, but the conditions are less well known.

In contrast to the latent state, entering the lytic cycle corresponds to the activation of more than 80 genes [14]. Gene expression is coordinated over time and the activation of the very early transactivators BZLF1 and BRLF1 induces the expression of the immediate early (IE) genes, leading to the expression of early (E) genes, including those necessary for genome replication followed by late (L) genes which encoding structural proteins [15,16].

EBV is involved in various B cell malignancies, such as endemic BL where it is found in about 80% of cases [17], HL with 30% of cases associated with the virus, especially mixed cellularity classical HL (MC-cHL), and more rarely immunoblastic lymphomas occurring

in immunocompromised patients. The oncogenic role of EBV, and in particular the role of the different latency proteins, is now well established [18]. EBV is also implicated in carcinomas such as NPCs where it is always present, or gastric carcinomas (GCs) where it is detected in approximately 10% of cases [18]. Peripheral T-cell lymphomas (PTCLs), which are uncommon pathologies since they represent 15% of non-Hodgkin's lymphomas (NHLs), are occasionally associated with EBV. For example, in extranodal NK/T-cell lymphomas, the virus, detected in 71% of cases, infects tumor cells where it is constantly detected. Angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL), which is the focus of our work, is probably the most common form of PTCL [19] although less common in North America or Asia than in Europe, accounting respectively for 16–34.4%, 17.9–22.4%, and 28–34% of PTCLs [20,21]. AITL, which mostly affects elderly people [22], is clinically characterized by generalized lymphadenopathy often accompanied by hepatosplenomegaly, skin rash, and B-cell modifications associated with immunologic abnormalities. This is an aggressive lymphoma with a poor prognosis. Pathologic findings reveal abolished lymph node architecture with an extensive polymorphous inflammatory infiltrate including EBV-positive B-cells adjacent to neoplastic cells of T follicular helper origin (Tfh). Increased numbers of follicular dendritic cells are observed near abundant arborescent endothelial venules. EBV is detected in 85–95% of AITL, being most often present in large B blasts, but sometimes described in neoplastic T cells [23–27]. It has been proposed that AITL generates an immunodeficiency at the origin of EBV reactivation promoting the expansion of Tfh and B cells, thus playing a role in the development of the tumor microenvironment. Or EBV itself could induce AITL development by activating Tfh cells [28] unless the interaction between B lymphocytes and neoplastic cells provides support for tumor development [29]. Depending on the hypotheses considered, the mechanisms are different.

For these reasons, in this study, we examined the EBV transcriptome in 14 AITL biopsies compared to other EBV positive lymphomas and cell lines by RNA-seq. We demonstrated for AITLs a significant expression of BARTs superior to that observed for other lymphomas. In addition, we reported that AITLs exhibited latency IIc with a strong expression of *BNLF2a*. A group of six late genes was also expressed (*BCRF1*, *BSRF1*, *BVRF1*, *BNRF1*, *BFRF3*, and *BOLF*).

2. Results

2.1. Analysis of EBV Gene Expression by New Generation Sequencing (NGS)

We performed massive parallel sequencing by NGS after mRNA enrichment then EBV transcripts capture, to evaluate the EBV transcriptome in 11 EBV positive human lines, which included 4 LCLs, and 35 EBV positive lymphomas from patients, including 14 AITLs, selected based on EBV positivity by *in situ* hybridization (ISH). Unfortunately, we did not have enough material to study which cells carried the virus. NGS results are shown in Table 1; mean read number per sample was 2,477,173 (from 600,000 to 10,066,666) with a depth comprised between 42 and 2,010 (mean depth 378). Data were submitted to SRA and are available under BioProject ID PRJNA686869. As could be expected, all patient samples were EBV type 1. EBV type 1 is more prevalent and also more virulent than type 2 EBV, which is mainly confined to the African continent.

2.2. AITL Samples Are Not Homogeneous

Analysis of results for all patients showed that samples from the 14 AITL patients did not form a cluster (Figure 1). The same was also found for the other pathologies, although the number was low in each case. It was notable that a group of patients, comprising various pathologies (3 AITL, 1 PTCL-NOS, 1 CTCL, 1 NLPHL, and 1 DLBCL), expressed a much larger variety of different viral genes than the others. It can also be noticed that a group of genes including latency genes (*EBNA-1*, *LMPs*, *EBNA-2*, and *BARTs*), and 17 other genes were expressed for the majority of patients while the other genes were only slightly or not expressed at all.

Table 1. Results obtained for Epstein–Barr virus (EBV) gene expression by new generation sequencing (NGS) for the 11 cell lines and 35 patient samples studied.

Sample Name	Read Number	Mean Depth	EBV Type
B95-8	10,053,705	2010	EBV-1
CoAN	1,942,331	1251	EBV-1
DPL	3,490,546	1326	EBV-1
Jijoye	5,538,086	1586	EBV-1
KREB2	2,194,143	117	EBV-1
MECO4	894,293	61	EBV-2
MLEB2	2,351,251	537	EBV-1
Namalwa	2,697,676	778	EBV-2
P3HR1	3,622,454	698	EBV-1
Raji	1,993,483	65	EBV-1
SNK6	3,175,449	971	EBV-2
PTBL5	1,033,508	63	EBV-1
DLBCL3	1,071,114	42	EBV-1
AIL7	1,248,228	71	EBV-1
ARL2	3,254,648	873	EBV-1
AIL15	2,356,168	626	EBV-1
ALCL1	1,782,932	78	EBV-1
AIL25	3,143,910	751	EBV-1
AIL24	1,204,758	56	EBV-1
AIL27	889,930	45	EBV-1
AIL2	2,024,732	92	EBV-1
AIL11	910,244	47	EBV-1
DLBCL4	1,764,060	301	EBV-1
PTBL4	1,494,164	385	EBV-1
AIL3	1,066,140	46	EBV-1
CTCL1	4,930,412	792	EBV-1
PTBL6	1,009,426	180	EBV-1
AIL14	1,948,266	553	EBV-1
AIL16	1,214,934	63	EBV-1
NLPHL2	2,009,568	45	EBV-1
NS.CHL1	566,500	51	EBV-1
NS.CHL3	3,573,262	861	EBV-1
MC.CHL1	1,907,892	133	EBV-1
AIL22	1,168,146	46	EBV-1
NS.CHL2	3,669,640	48	EBV-1
AIL23	2,096,084	47	EBV-1
AIL26	1,360,172	42	EBV-1
PTCL.NOS4	1,752,840	45	EBV-1
AIL21	2,526,360	102	EBV-1
ALCL2	4,104,334	43	EBV-1
CTCL2	1,376,010	159	EBV-1
CTCL3	1,495,068	124	EBV-1
PTCL.NOS5	2,894,860	47	EBV-1
PTCL.NOS3	1,361,598	42	EBV-1
NLPHL1	2,610,342	74	EBV-1
DLBCL5	8,303,756	1027	EBV-1

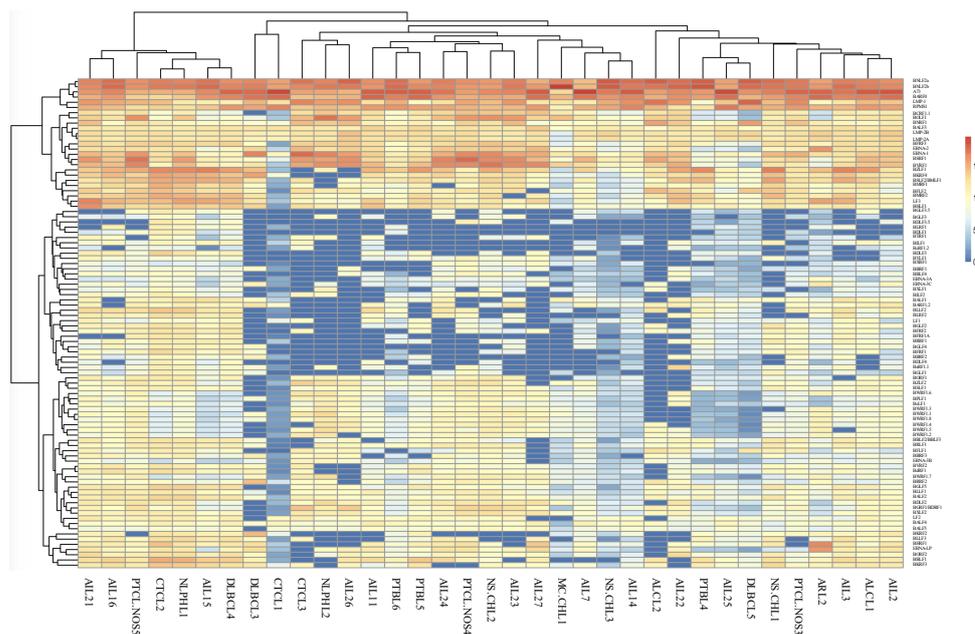


Figure 1. Heatmap of EBV gene expression for the 14 angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL) and 21 other EBV-associated lymphomas.

2.3. BARTs Are the Most Abundant Latency Transcripts in Lymphoma Samples

We analyzed the viral transcripts present in samples and, because we performed a poly(A)+ capture before sequencing, we did not detect any non-polyadenylated transcripts, for example, the EBERs.

For AITLs, the results obtained show that the most expressed latency transcripts are BARTs (Figure 2B), which was much less frequent for other patients (Figures 2A and 3). The BARTs constitute a complex set of differentially spliced polyadenylated RNAs that share the same 3' end and originate from several putative open reading frames, namely BARF0, RPMS1, and A73 [30]. Our results showed increased expression of A73 and BARF0 relative to RPMS1 in AITLs.

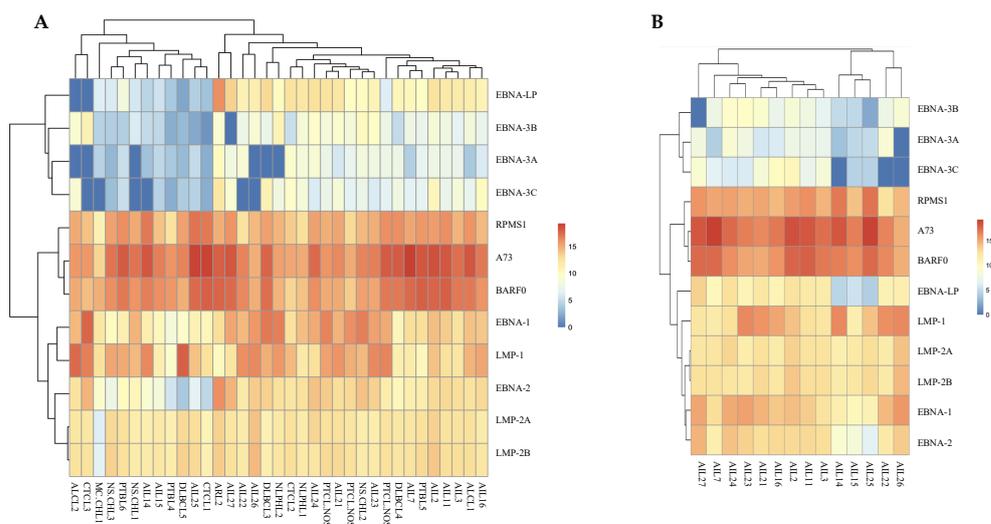


Figure 2. EBV latency gene expression analysis. (A) A heatmap shows results obtained for all patient samples tested. (B) Heatmap of latency transcripts for AITLs.

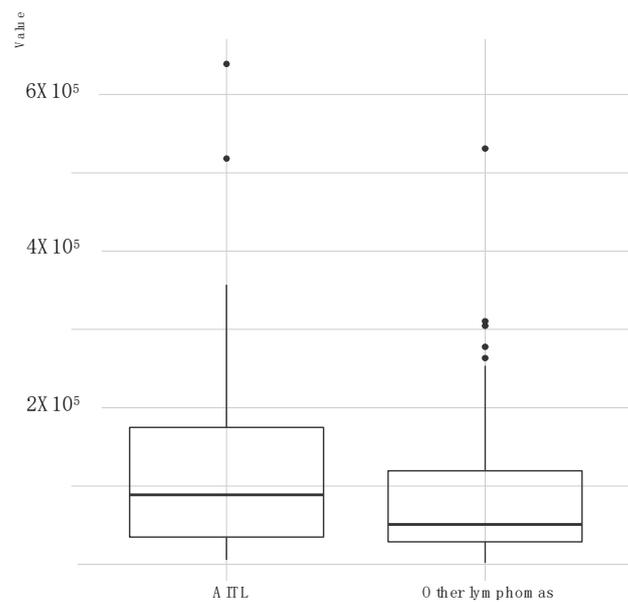


Figure 3. Distribution of BARTs (BARF0, A73, RPMS1) genes expression for AITL lymphomas comparatively to other lymphomas. For each group, a boxplot is represented showing the lower and upper quartile (the 25th and 75th percentiles, respectively). Line inside boxplot shows the median whereas vertical lines outside the box represent the minimum and maximum (0th and 100th percentile) excluding outliers.

2.4. All AITL Samples Tested Are in Latency II but Show Strong Expression *BNLF2a*

AITL biopsies and more largely all patient samples tested carried latency II EBV as evidenced by the lack of EBNA-3 expression (Figure 2A). Nevertheless, all but 3 AITL contained EBNA-2 and EBNA-LP transcripts. Moreover, expression of the viral transcription factor BZLF1 was present with weak expression of BRLF1 and lack of expression of all proteins of the lytic cycle (Figure 4). However, it is very remarkable that some lytic genes were expressed especially the early gene *BNLF2a*. Among the lytic genes, it seems that six of them, the late genes *BCRF1*, *BSRF1*, *BVRF1*, *BNRF1*, *BFRF3*, and *BOLF1*, present a clustered expression in the majority of AITLs. Interestingly, *BCRF1* encodes for a protein that shows great homology with human interleukin-10 (IL-10) and is referred to as v-IL-10.

2.5. Cell Line Sequencing

We studied the EBV transcriptome in B95-8 line, initially obtained from a primary infection, in four BL lines (Jijoye, Namalwa, P3HR1, and Raji), in two NK/TL lines (SNK6 and MEC04), characteristics of which are mentioned in Table 2 and in four LCL that we established (CoAN, DPL, KREB2, and MLEB2).

It may be noted that the cell lines expressed little or no EBNA-3 and that only LCL and Raji expressed EBNA-2 (Figure 5). BARTs were much more present in LCLs than in other cell lines, except MEC04. It is noteworthy that, apart from DPL, cell lines clustered and behaved homogeneously regardless of their origin. Among the genes most expressed in the lines is *BHRF1* which codes for a bcl2 homolog and miRNAs. EBNA-LP was also highly expressed in all cell lines except MEC04. It can be noticed that MEC04 has a very different profile from other lines.

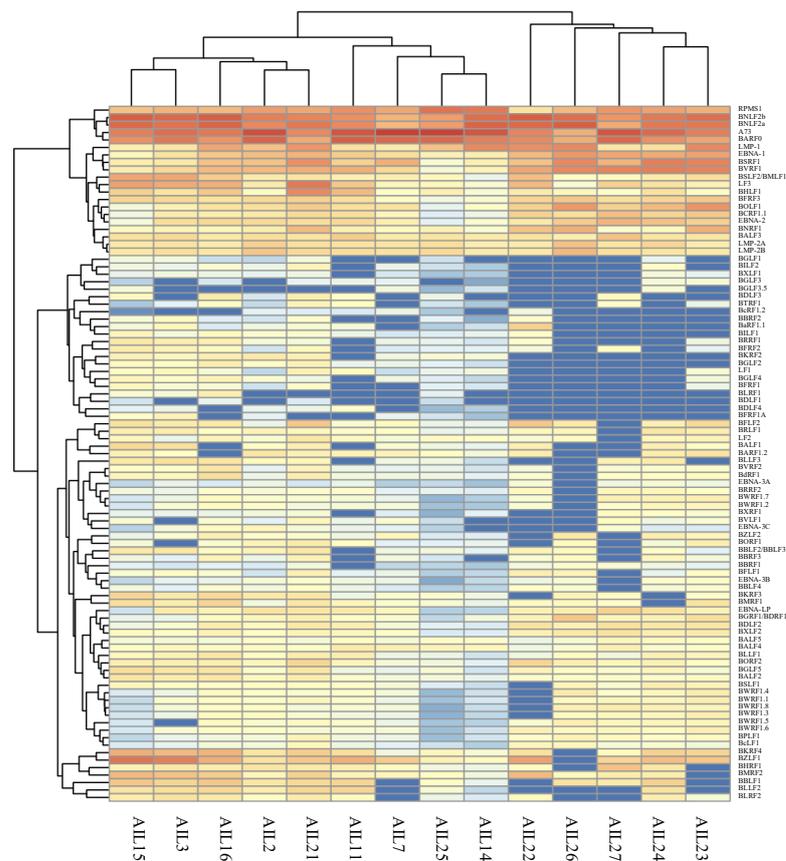


Figure 4. Heatmap of all EBV gene expression for AITLs.

Table 2. Characteristics of the cell lines used in this work.

Cell Line	Origin	Latency Type	Particularity
B95.8	Primary infection [31]	Lat III [32]	Deletion 139,724 bp to 151,554 bp: <i>OriLyt</i> —large part of miRNA <i>BART</i> — <i>LF-1</i> , -2, -3 [31,33,34]
Jijoye	Endemic Burkitt’s lymphoma [35]	Lat III [36]	No deletion
Namalwa	Endemic Burkitt’s lymphoma [37]	Lat I [38] Lat III [36]	2 copies of EBV genome integrated into the human chromosome [39]
P3HR1	Burkitt’s lymphoma [40]	Lat I [36] Lat II [41] Atypical latency [42]	Derived from Jijoye—Deletion (33,355 bp to 40,163 bp): <i>EBNA-2</i> , part of <i>EBNA-LP</i> , part of <i>BHLF-1</i> [34,38,43]
Raji	Burkitt’s lymphoma [44]	Lat III [36] Lat I/Lat III (in vitro) [38]	Two deletions (99,126 bp to 102,118 bp and 163,978 bp to 166,635 bp): <i>EBNA-3C</i> , <i>BZLF2</i> , <i>BARF1</i> , <i>BALF1</i> , <i>BALF2</i> [45,46]
MEC04	NK/T lymphoma [47]	Lat II [47]	
SNK6	NK/T lymphoma [48]	Lat II [48]	<i>EBNA-2</i> not expressed [49,50]

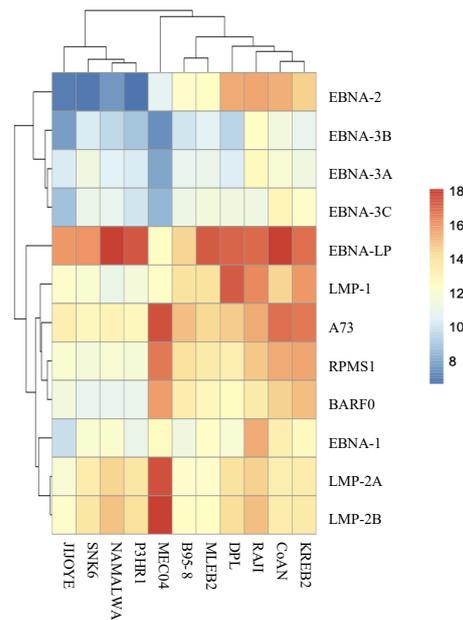


Figure 5. EBV gene expression analysis in the cell lines studied: heatmap of latency transcripts.

The deletions described for some lines resulted, when they affect the entire gene, in a lack of expression particularly clearly visible in the case of *LF1*, *LF2*, and *LF3* for B95-8 or *EBNA-2* for P3HR1 (Figure 6).

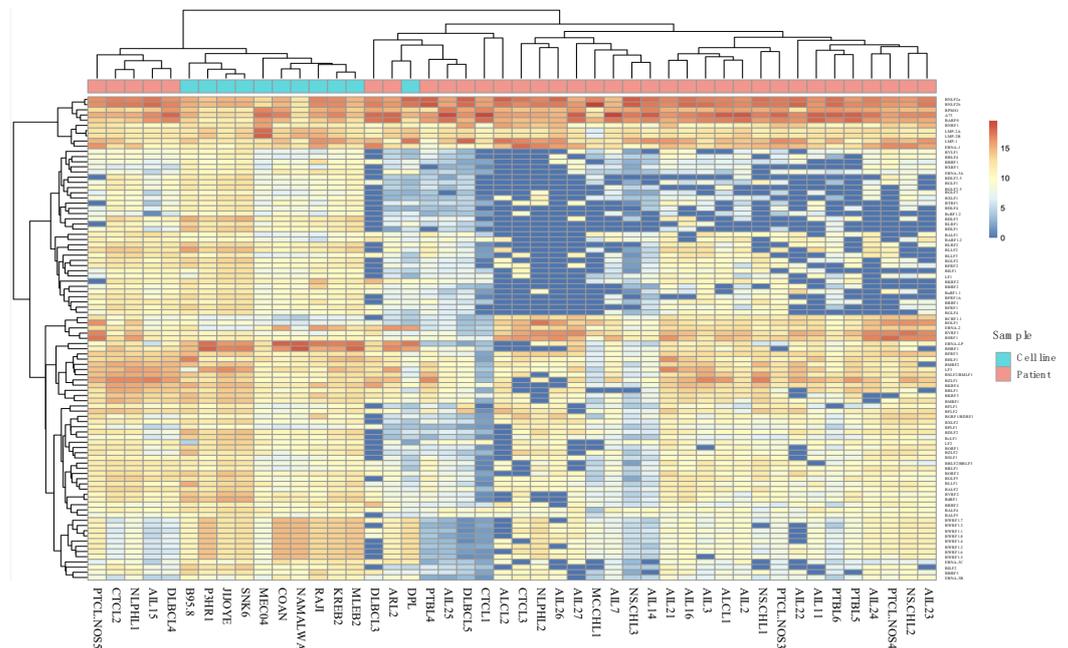


Figure 6. Heatmap of EBV gene expression for the patients and the cell lines.

3. Discussion

In this study, we wanted to assess the expression level of viral transcripts in AITL in comparison to some lymphadenopathies from other lymphomas. Cell lines were also used as a comparative element as the type of latency they carry has already been established.

Overall, there was no obvious difference between AITLs and other lymphomas and there was no clustering of AITLs. Gene expression varies according to lymphoma and even between tumors of the same pathology. Interestingly, there was no complete lytic

cycle among AITLs, therefore no viral reactivation which makes it possible to produce new infectious particles.

RNaseq analysis assessed the respective quantity of transcripts and revealed that among the latency transcripts, the BARTs were very largely predominant. BARTs were expressed in very high amounts in all AITLs and more broadly they were also found in abundance in other patients. BARTs were initially demonstrated in NPC xenografts [51] as well as in NPC biopsies [52] and also in BL biopsies [53]. Verhoeven et al. [54] described high BART expression in NPC and discussed their role in this pathology. BARTs have also been highlighted in GCs [55] where their strong expression could contribute to growth regulation and would therefore constitute a mechanism of viral oncogenesis [56]. Thus, it has been gradually accepted that BARTs are very strongly expressed in infected NPC and GC epithelial cells, probably participating in these pathologies. Our findings show that BARTs were not only expressed in EBV epithelial malignancies but also at high levels in lymphomas and especially in AITLs. Most probably they are present in any form of cancer as suggested by Chakravorty et al. [17]. BARTs have been described as expressed in all latency phases, although predominantly during latencies I or II [57], and also during the lytic cycle. Although the putative proteins encoded by BARTs show potentially significant properties with regards to cell transformation [51], they never have been detected in vivo [30,58]. Since a nuclear localization of these persistent RNAs has been reported, it has been suggested that they function as long non-coding RNAs (lncRNAs) that selectively regulate viral and/or cellular gene expression [54]. BARTs also encode mature intronic micro RNAs (miRNAs) many of which are expressed at a high rate in the same tumors which carry BARTs. These miRNAs mainly contribute to tumor development or growth by ensuring the maintenance of latency by blocking lytic transcripts, and also by blocking the immune defenses [59,60]. The fact that BART transcripts were found in abundance in our AITL patients suggests that they play an important role in this pathology, whether they act in the form of lncRNAs and/or miRNAs.

In this study, it is remarkable that the *BNLF2a/BNLF2b* genes, described as early lytic genes, are strongly expressed in patient samples and especially for AITLs; they are even the most expressed genes (Figure 4). In the AITL biopsies we tested, the virus could be considered to be in latency II due to the absence of EBNA-3 expression. However, the expression of EBNA-2, and to a lesser extent EBNA-LP, in at least 11 out of the 14 tissues tested, does not support a latency IIa state. This was also found in 57.1% of other patients. Moreover, the simultaneous LMP-1 expression excludes the hypothesis of latency IIb. We wondered if the virus was starting to reactivate. Resumption of a lytic cycle begins with the induction of viral transcription factors, particularly *BZLF1* and *BRLF1*, and activation of viral promoters. Subsequently, the initiation complex, composed of the six viral factors, *BMRF1*, *BSLF1*, *BBLF4*, *BBLF2/3*, *BALF5*, and *BALF2*, is formed [61,62]. For our patients, apart from *AIL26*, *BZLF1* was highly expressed while *BRLF1* was little or not expressed. More, among the six mentioned genes, only *BMRF1* was expressed. Therefore, it seems to us that the virus is certainly in a latent state. This is why it is surprising to find such high levels of *BNLF2a* expression. *BNLF2a* expression has already been reported during latency, but mainly in carcinomas, especially GC [55] and non-small-cell lung carcinoma (NSCLC) [63], but not in lymphoma to our knowledge. It has even been proposed to call this latency, which includes the expression of EBNA-1, LMP-2, and *BNLF2a*, latency IIc [64]. This type of latency was carried by 11/14 of the AITLs we tested.

BNLF2a has been described to inhibit binding of peptides and ATP to the transporter activated peptide (TAP), resulting in down-regulation of the HLA class I proteins, thus blocking antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes [65,66]. *BNLF2a* is expressed early in the productive lytic cycle to prevent infected cells from the recognition by CD8+ T cells sensitized to IE or E viral antigens [67], or in the pre-latent phase in B cells immediately following infection. A very high level of *BNLF2a* expression certainly makes it possible to protect the infected (tumor) cell from immune defenses. In addition, most AITL patients co-express *BCRF1*, a late gene encoding for the vIL-10 protein that has 80% homology with

hIL-10. vIL-10 protects infected B cells from NK cell-mediated elimination, can inhibit CD4+ cell responses and the production of inflammatory cytokines [68], and promotes subsequent B cell proliferation and differentiation [69]. Jochum et al. [65] demonstrated that coexpression of *BNLF2a* and *BCRF1* contributes to the immune evasion of EBV during the very early phase of lytic infection. It can be assumed that, likewise, the simultaneous expression of these two proteins promotes the survival of infected cells and tumors.

In addition to *BCRF1*, five other late genes were expressed in almost all AITL samples. This strongly expressed gene cluster is made up of *BSRF1*, *BVRF1*, *BNRF1*, *BFRF3*, and *BOLF1*. Apart from *BCRF1* and *BNRF1*, which would play a role in cell immortalization, the others, as far as is known today, encode tegument or capsid proteins. Clusters of lytic genes activated during latency have been described by others in NPC, GC, or BL [70], but the genes differ from those found here.

To better understand the behavior of EBV in lymphoma tissues, we decided to compare the results we obtained for our patients with those obtained for cell lines. We, therefore, studied the EBV transcriptome in the following lines: B95-8, four BL lines, two NK/TL lines, and four LCLs. Surprisingly, we did not find viral behavior specific to a pathology, just as LCLs do not all behave in the same way. Latency gene expression was particularly interesting, and EBNA-LP was highly expressed in all lines except MEC04. BARTs were somewhat more expressed in LCLs than in other lines, although the expression was low. As expected, our LCLs were found to be in latency III although, depending on the lines, the latency genes were expressed to varying degrees. The BL lines, that are derived from tumors exhibiting latency I, were mostly in latency I, while expressing *EBNA-LP* (Jijoye, Namalwa, P3HR1), or latency III for Raji, with a weak EBNA-3 expression. This latency change for Raji has already been reported and is due to growing conditions [38,71].

Interestingly, our lines showed much lower BART expression than patient tumors apart from the MEC04 line which had a very unique behavior. The MEC04 cell line was initially established from a patient with a fatal nasal NK-cell lymphoma at a leukemic stage [47]. MEC04 is the only line, among those studied here, strongly expressing BARTs as well as LMP2, while EBNA-1, LMP1, and EBNA-LP were weakly expressed and the other latency transcripts absent. Interestingly, Coppo et al. [47] reported that the STAT3 transcription factor is constitutively activated in the MEC04 cells line and suggested that STAT3 plays a primary role in nasal-NK/TL physiopathology. Recently, it was demonstrated that, in B lymphocytes, LMP2A, constitutively associated with Src family protein tyrosine kinases (PTKs) such as Syk, activates the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Akt pathway [72]. Then, Bruton's tyrosine kinase (BTK), regulated by PI3K, phosphorylates STAT3 which in turn activates cellular IL-10 [73]. The constitutive activation of STAT3 described by Coppo, therefore, appears to reflect the constitutive production of LMP2A by these cells. Results are very different from the other NK/TL line we studied, SNK6.

Among the most expressed genes in all lines was *BHRF1* which otherwise was very weakly expressed in patient samples. It encodes a protein whose role is poorly defined but which is a bcl-2 homolog and therefore exhibits anti-apoptotic properties essential for cell transformation [74,75]. EBV also encodes *BHRF1* miRNAs which are consistently present in the early stages of infection. They restrict *BHRF1* protein production and are also detectable in LCLs [76]. They contribute to B-cell transformation and proliferation [77]. Interestingly, EBV-miR-*BHRF1-2* has been shown to downregulate *LMP2A*. In this study, the MEC04 line is the only one that expressed, albeit very weakly, *BHRF1* and *LMP2A* were, in contrast, highly expressed.

4. Materials and Methods

4.1. Production of Spontaneous LCLs

Spontaneously growing EBV-positive B-cell lines (LCLs), CoAN, DPL, KREB2, and MLEB2 cell lines, were established from the peripheral blood of four subjects whose characteristics are reported in Table 3. Lines were spontaneously established through the use of cyclosporin A [78] according to the protocol described by Sculley et al. [79].

Table 3. Characteristics of lymphoblastoid cell line (LCL) origin patients.

Cell Line	Patient Age	Patient Sex	Patient Pathology
CoAN	61	F	Renal cell carcinoma and hepatocellular carcinoma
DPL	46	M	Cardiac AL λ amyloidosis
KREB2	64	M	Parsonage-Turner syndrome
MLEB2	66	M	Healthy subject

4.2. Cell Lines and Culture

In addition to the LCLs established in our laboratory, seven other lines were used, the characteristics of which are mentioned in Table 3. B95-8 and the four BL lines (Jijoye, Namalwa, P3HR1, and Raji) were purchased from the ATCC (Catalog numbers CRL 1612—ECACC 85011419, CCL-87, CRL-1432, HTB-62, and CCL-86 respectively, Manassas, VA, USA). The extranodal NK/T cell lymphoma lines (MEC04 and SNK6) were kindly provided by Marion Travert (Inserm U955, Hôpital Henri Mondor, Créteil, France). All lines were grown in RPMI1640 medium with glutaMAX (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France; catalog number 61870-010) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Eurobio Scientific, Les Ulis, France; catalog number CVFSVF00-0U) and 1% penicillin-gentamicin at 37 °C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. MEC04 and SNK6 cell lines were cultured under the same conditions and supplemented with 100 U/mL of human IL-2 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; catalog number I7908).

4.3. Patients

The population included in this study was composed of 14 patients with AITL and 21 other patients suffering from HL or B or T non-HL lymphoma (Table 4). All patients were initially diagnosed at Limoges University Hospital (France) after independent examination by two pathologists using WHO criteria [80]. Patients gave informed consent for the subsequent use of the samples taken and the study was retrospectively carried out on the lymphadenopathy used for the initial diagnosis. The study was approved by the Ethics Committee of the Institutional Review Board as part of ongoing studies, some of which being published soon. The patients were selected based on sample positivity for EBER, providing evidence of EBV infection.

4.4. EBER In Situ Hybridization

Detection of EBER1 by ISH was used to determine the presence of EBV allowing sample selection. Briefly, the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue sections were deparaffinized, rehydrated in a graded solution of xylene and alcohol, then deproteinized with proteinase K before incubation with the Ventana EBER 1 DNP Probe[®] (Roche Diagnostics, Meylan, France; catalog number 760-1209) on the Benchmark XT automaton[™] (Roche Diagnostics). This was followed by staining with Ventana ISH iVIEW blue plus detection kit[®] (Roche Diagnostics; catalog number 760-097) on the same apparatus.

Table 4. Characteristics of the 14 AITLs and 21 other EBV-associated lymphomas patients included in this study.

Patient	Sex	Age at Diagnosis	Pathology According to WHO Criteria (2016)
AIL2	M	62	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL3	M	80	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL7	F	59	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL11	M	59	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL14	M	62	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL15	M	67	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL16	M	50	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL21	M	79	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL22	M	70	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL23	M	67	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL24	F	78	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL25	M	59	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL26	M	69	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
AIL27	F	69	Angioimmunoblastic T-cell lymphoma
PTCL-NOS3	M	81	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
PTCL-NOS4	M	69	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
PTCL-NOS5	F	80	Peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified
ALCL1	F	73	Anaplastic large T cell lymphoma
ALCL2	M	20	Anaplastic large T cell lymphoma
CTCL1	F	73	Cutaneous T cell lymphoma
CTCL2	M	63	Cutaneous T cell lymphoma
CTCL3	M	83	Cutaneous T cell lymphoma
NLPHL1	M	68	Nodular lymphocyte-predominant type Hodgkin's lymphoma
NLPHL2	M	33	Nodular lymphocyte-predominant type Hodgkin's lymphoma
NS-CHL1	M	20	Nodular sclerosis classical Hodgkin's lymphoma
NS-CHL2	M	73	Nodular sclerosis classical Hodgkin's lymphoma
NS-CHL3	F	67	Nodular sclerosis classical Hodgkin's lymphoma
MC-CHL1	M	77	Mixed cellularity classical Hodgkin's lymphoma
DLBCL3	F	59	Diffuse large B-cell lymphoma
DLBCL4	F	31	Diffuse large B-cell lymphoma
DLBCL5	F	59	Diffuse large B-cell lymphoma
PTBL4	F	52	Post-transplant B lymphoma
PTBL5	F	68	Post-transplant B lymphoma
PTBL6	M	57	Post-transplant B lymphoma
ARL2	F	76	Age-related lymphoma

For EBV positive samples, further work was performed on frozen material collected at the same time as the FFPE tissue.

4.5. EBV Typing

To determine the type of EBV present in each patient sample, we aligned sequences obtained against the unique EBNA-2/EBNA-3 regions of the prototype genomes of EBV type 1 (NC_007605) and type 2 (NC_009334) EBV. The prototype strain for which a greater number of reads matched for a given sample corresponded to the type of that sample.

4.6. RNA Extraction

Total RNA was extracted from cell lines and frozen biopsies by using the RNeasy mini kit[®] (Qiagen, Les Ulis, France; catalog no. 74104) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I by using RNase-free DNase set[®] (Qiagen, catalog no. 79254). The frozen biopsies were previously disrupted and homogenized by adding lysis buffer and using the Precellys 24 tissue homogenizer[™] (Bertin Instruments, Montigny Le Bretonneux, France) while the lines were directly lysed by lysis buffer. Extracted RNA was re-suspended in RNase-free water. RNA was then quantified and quality was determined using the Agilent RNA 6000 Nano Kit[®] (Agilent Technologies, Les Ulis, France; catalog no. 5067-1511) on the Agilent 2100 Bioanalyzer[™] to obtain the RNA integrity number (RIN).

4.7. mRNA Enrichment

In brief, 700 ng high-quality total RNA, with a RIN ≥ 9 , was used as input for each sample. Poly(A) mRNAs were selected by using oligo(dT) beads in a KAPA mRNA capture kit[®] (Roche Diagnostics; catalog number 07962231001) according to the manufacturer's protocol.

4.8. Probe Design for EBV Sequence Capture

The prototype genomes of EBV type 1 (NC_007605) and type 2 (NC_009334) EBV were used as references for designing EBV probes (Roche NimbleGen, Madison, WI, USA). Probes (100 to 120 bp) were designated to be overlapping and cover the entire viral genomes a minimum of 5 times, without matching the human hg19 genome (GRCh38.p13), as determined by the SSAHA algorithm. Coverage for EBV-1 and EBV-2 genomes was estimated at 99.7% and 99.9%, respectively (a probe was considered to match the genome if there were fewer than five insertions, deletions, or substitutions of a single base between it and the genome). The vast majority of designated probes were unique, although some probes had a higher degree of multi-locus homology to increase coverage of all regions.

4.9. Sequencing by NGS

We used the high-throughput Illumina MiSeq[™] system (Illumina, Evry-Courcouronnes, France) to analyze the EBV transcriptome in the cell lines and selected patient samples (Bronner). The technique consists of an EBV mRNA capture from the poly(A) mRNAs by using NimbleGen SeqCap RNA Enrichment System[™] (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol. Briefly, sample libraries were prepared using the KAPA Stranded RNA Library Preparation kit[®] (Roche; catalog number 07962142001). Selected poly(A) mRNAs were first fragmented by enzyme digestion. Then first and second cDNA strands were synthesized and the obtained fragments were blunt-ended. A tailed and ligated to specific adapters from SeqCap Adapter kits[®] A and B (Roche; catalog number 07141530001 and 07141548001, respectively). Subsequently, sample libraries were amplified for 11 cycles by a ligated mediation PCR (LM-PCR). At this step, a qualitative control using the High Sensitivity DNA kit[®] (Agilent Technologies, catalog number 5067-4626) on the Agilent 2100 Bioanalyzer and a quantitative one using Qubit dsDNA HS Assay Kit[®] (Invitrogen, catalog number Q32854) were performed. The amplified sample libraries were then pooled in equal molar quantities and hybridized to EBV biotinylated probes at 47 °C for 3 days consecutively using SeqCap Hybridization and Wash Kit[®] (Roche; catalog number 05634261001). At that

time, the hybridized fragments were recovered by magnetic streptavidin-beads (SeqCap Pure Capture Bead kit[®], Roche; catalog number 06977952001) and enriched by 14 cycles of LM-PCR using SeqCap EZ Accessory kit v2[®] (Roche; catalog number 07145594001). Size selection was performed during library preparation using a single Agencourt AMPure XP treatment from SeqCap Pure Capture Bead kit[®], to remove DNA fragments below 200 bp. The final concentration was measured by the Agilent High Sensitivity DNA kit and libraries were finally 2 × 300-base paired-end sequenced on an Illumina MiSeq instrument[™] (ICM, Paris, France).

The sequencing of all cell lines was carried out in its entirety in triplicate.

4.10. Data Analysis

Data obtained were checked for quality using FastQC v 0.11.5 (Babraham bioinformatics, Cambridge, UK) and no trimming was done. Raw sequencing reads were aligned against hg19 (GRCh38.p13), EBV1 (NC_007605.1), and EBV2 (NC_009334.1) reference genomes using bwa mem 0.7.17-r1188. Data were then quantified using featureCounts 1.6.0 (Walter and Eliza Hall bioinformatics, Melbourne, Australia). Data normalization and differential expression analysis were performed using a custom script to obtain transcripts per million (TPM). Samples were then averaged and put in log. Statistically, differentially-expressed genes were visualized with heatmaps (false discovery rate less than 0.05) using pheatmap (Raivo Kolde, University of Tartu, Tartu, Estonia), tidyverse (Hadley Wickham, University of Auckland, Auckland, New Zealand), hrbthemes (Bob Rudis, Rapid7, Cambridge, USA), and viridis (Simon Garnier, New Jersey Institute of Technology, Newark, NJ, USA) R packages (built under R version 4.0.2).

5. Conclusions

In summary, our EBV transcriptome study on 14 AITL biopsies was compared to the results obtained for the other lymphomas tested and showed that BARTs were much more strongly and more frequently expressed for AITLs suggesting that they might play a role in this lymphoma. We have shown that AITLs exhibited a latency corresponding to the latency IIc described by Strong et al. [64] and that the simultaneous expression of BNLF2a and BCRF1 may allow infected cells to survive. Taken together, these results suggest the involvement of EBV in this pathology.

Author Contributions: Conceptualization, S.R.-R.; data curation, A.C. and A.J.; formal analysis, N.B. and V.T.; funding acquisition, S.R.-R.; investigation, N.B., R.B., and M.A.H.; methodology, S.R.-R.; project administration, S.R.-R.; software, V.T.; supervision, J.F. and S.R.-R.; writing—original draft, N.B. and S.R.-R.; writing—review and editing, S.R.-R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grants provided by the “Ligue contre le Cancer (Comité Haute-Vienne and Comité Creuse)” and promoted by the “Centre Hospitalier Universitaire,” Limoges, France.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. This work was carried out on biological samples from the biological collection (declaration number DC-2010-1074) of the Biological Resource Center of Limoges University Hospital (CRBioLim). The medical-scientific council gave its approval on 07/26/2016 under the number CRB-103.

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article. EBV gene expression data generated in this study have been deposited as stated above (Section 2.1).

Acknowledgments: We thank Jeanne Cook-Moreau for her help in proofreading English, Franck Trimoreau for his help in the hematological classification of patients, Eden Lebrault (Molecular Analysis) and Guillaume Boulesteix (CRBioLim).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- McGeoch, D.J.; Gatherer, D. Lineage Structures in the Genome Sequences of Three Epstein-Barr Virus Strains. *Virology* **2007**, *359*, 1–5. [[CrossRef](#)]
- Smatti, M.K.; Al-Sadeq, D.W.; Ali, N.H.; Pintus, G.; Abou-Saleh, H.; Nasrallah, G.K. Epstein-Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Front. Oncol.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Longnecker, R.; Neipel, F. Introduction to the human γ -herpesviruses. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*; Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007; ISBN 978-0-521-82714-0.
- Wang, C.; Li, D.; Zhang, L.; Jiang, S.; Liang, J.; Narita, Y.; Hou, I.; Zhong, Q.; Zheng, Z.; Xiao, H.; et al. RNA Sequencing Analyses of Gene Expression during Epstein-Barr Virus Infection of Primary B Lymphocytes. *J. Virol.* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)]
- Hutchings, I.A.; Tierney, R.J.; Kelly, G.L.; Stylianou, J.; Rickinson, A.B.; Bell, A.I. 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.* **2006**, *80*, 10700–10711. [[CrossRef](#)]
- Kang, M.-S.; Kieff, E. Epstein-Barr Virus Latent Genes. *Exp. Mol. Med.* **2015**, *47*, e131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Marques-Piubelli, M.L.; Salas, Y.I.; Pachas, C.; Becker-Hecker, R.; Vega, F.; Miranda, R.N. Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders and Lymphomas: A Review. *Pathology* **2020**, *52*, 40–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Young, L.S.; Arrand, J.R.; Murray, P.G. EBV gene expression and regulation. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*; Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., Moore, P.S., Roizman, B., Whitley, R., Yamanishi, K., Eds.; Cambridge University Press: Cambridge, UK, 2007; ISBN 978-0-521-82714-0.
- Grywalska, E.; Rolinski, J. Epstein-Barr Virus-Associated Lymphomas. *Semin. Oncol.* **2015**, *42*, 291–303. [[CrossRef](#)]
- Rasul, A.E.; Nagy, N.; Sohlberg, E.; Ádori, M.; Claesson, H.-E.; Klein, G.; Klein, E. Simultaneous Detection of the Two Main Proliferation Driving EBV Encoded Proteins, EBNA-2 and LMP-1 in Single B Cells. *J. Immunol. Methods* **2012**, *385*, 60–70. [[CrossRef](#)]
- Klein, E.; Nagy, N.; Rasul, A.E. EBV Genome Carrying B Lymphocytes That Express the Nuclear Protein EBNA-2 but Not LMP-1: Type IIb Latency. *Oncoimmunology* **2013**, *2*, e23035. [[CrossRef](#)]
- Price, A.M.; Luftig, M.A. To Be or Not IIb: A Multi-Step Process for Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Consequences for B Cell Tumorigenesis. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004656. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Messinger, J.E.; Dai, J.; Stanland, L.J.; Price, A.M.; Luftig, M.A. Identification of Host Biomarkers of Epstein-Barr Virus Latency IIb and Latency III. *mBio* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- McKenzie, J.; El-Guindy, A. Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Reactivation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *391*, 237–261. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Concha, M.; Wang, X.; Cao, S.; Baddoo, M.; Fewell, C.; Lin, Z.; Hulme, W.; Hedges, D.; McBride, J.; Flemington, E.K. Identification of New Viral Genes and Transcript Isoforms during Epstein-Barr Virus Reactivation Using RNA-Seq. *J. Virol.* **2012**, *86*, 1458–1467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Sivachandran, N.; Wang, X.; Frappier, L. Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection. *J. Virol.* **2012**, *86*, 6146–6158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chakravorty, S.; Yan, B.; Wang, C.; Wang, L.; Quaid, J.T.; Lin, C.F.; Briggs, S.D.; Majumder, J.; Canaria, D.A.; Chauss, D.; et al. Integrated Pan-Cancer Map of EBV-Associated Neoplasms Reveals Functional Host-Virus Interactions. *Cancer Res.* **2019**, *79*, 6010–6023. [[CrossRef](#)]
- Shannon-Lowe, C.; Rickinson, A. The Global Landscape of EBV-Associated Tumors. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 713. [[CrossRef](#)]
- De Leval, L.; Parrens, M.; Le Bras, F.; Jais, J.-P.; Fataccioli, V.; Martin, A.; Lamant, L.; Delarue, R.; Berger, F.; Arbion, F.; et al. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Is the Most Common T-Cell Lymphoma in Two Distinct French Information Data Sets. *Haematologica* **2015**, *100*, e361–e364. [[CrossRef](#)]
- Chiba, S.; Sakata-Yanagimoto, M. Advances in Understanding of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma. *Leukemia* **2020**, *34*, 2592–2606. [[CrossRef](#)]
- Vose, J.; Armitage, J.; Weisenburger, D. International T-Cell Lymphoma Project International Peripheral T-Cell and Natural Killer/T-Cell Lymphoma Study: Pathology Findings and Clinical Outcomes. *J. Clin. Oncol.* **2008**, *26*, 4124–4130. [[CrossRef](#)]
- 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. Clinicopathologic Characteristics of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Analysis of the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 240–246. [[CrossRef](#)]
- Anagnostopoulos, I.; Hummel, M.; Finn, T.; Tiemann, M.; Korbjuhn, P.; Dimmler, C.; Gatter, K.; Dallenbach, F.; Parwaresch, M.R.; Stein, H. Heterogeneous Epstein-Barr Virus Infection Patterns in Peripheral T-Cell Lymphoma of Angioimmunoblastic Lymphadenopathy Type. *Blood* **1992**, *80*, 1804–1812. [[CrossRef](#)]
- Beer, T.; Dorion, P. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma Presenting with an Acute Serologic Epstein-Barr Virus Profile. *Hematol. Rep.* **2015**, *7*, 5893. [[CrossRef](#)]
- Willenbrock, K.; Bräuninger, A.; Hansmann, M.-L. 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.* **2007**, *138*, 733–739. [[CrossRef](#)]

26. Xu, Y.; McKenna, R.W.; Hoang, M.P.; Collins, R.H.; Kroft, S.H. Composite Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A Case Report and Review of the Literature. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *118*, 848–854. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Zettl, A.; Lee, S.-S.; Rüdiger, T.; Starostik, P.; Marino, M.; Kirchner, T.; Ott, M.; Müller-Hermelink, H.K.; Ott, G. Epstein-Barr Virus-Associated B-Cell Lymphoproliferative Disorders in Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma and Peripheral T-Cell Lymphoma, Unspecified. *Am. J. Clin. Pathol.* **2002**, *117*, 368–379. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Dunleavy, K.; Wilson, W.H. Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Immune Modulation as a Therapeutic Strategy. *Leuk. Lymph.* **2007**, *48*, 449–451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Nakhoul, H.; Lin, Z.; Wang, X.; Roberts, C.; Dong, Y.; Flemington, E. High-Throughput Sequence Analysis of Peripheral T-Cell Lymphomas Indicates Subtype-Specific Viral Gene Expression Patterns and Immune Cell Microenvironments. *mSphere* **2019**, *4*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Smith, P.R.; de Jesus, O.; Turner, D.; Hollyoake, M.; Karstegl, C.E.; Griffin, B.E.; Karran, L.; Wang, Y.; Hayward, S.D.; Farrell, P.J. Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* **2000**, *74*, 3082–3092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Skare, J.; Edson, C.; Farley, J.; Strominger, J.L. The B95-8 Isolate of Epstein-Barr Virus Arose from an Isolate with a Standard Genome. *J. Virol.* **1982**, *44*, 1088–1091. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Hu, L.; Lin, Z.; Wu, Y.; Dong, J.; Zhao, B.; Cheng, Y.; Huang, P.; Xu, L.; Xia, T.; Xiong, D.; et al. Comprehensive Profiling of EBV Gene Expression in Nasopharyngeal Carcinoma through Paired-End Transcriptome Sequencing. *Front. Med.* **2016**, *10*, 61–75. [[CrossRef](#)]
33. Calderwood, M.A.; Holthaus, A.M.; Johannsen, E. The Epstein-Barr Virus LF2 Protein Inhibits Viral Replication. *J. Virol.* **2008**, *82*, 8509–8519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Parker, B.D.; Bankier, A.; Satchwell, S.; Barrell, B.; Farrell, P.J. Sequence and Transcription of Raji Epstein-Barr Virus DNA Spanning the B95-8 Deletion Region. *Virology* **1990**, *179*, 339–346. [[CrossRef](#)]
35. Southam, C.M.; Burchenal, J.H.; Clarkson, B.; Tanzi, A.; Mackey, R.; McComb, V. Hetero- Transplantation of Human Cell Lines from Burkitt's Tumors and Acute Leukemia into Newborn Rats. *Cancer* **1969**, *23*, 281–299. [[CrossRef](#)]
36. Greijer, A.E.; Ramayanti, O.; Verkuijlen, S.a.W.M.; Novalić, Z.; Juwana, H.; Middeldorp, J.M. Quantitative Multi-Target RNA Profiling in Epstein-Barr Virus Infected Tumor Cells. *J. Virol. Methods* **2017**, *241*, 24–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Klein, G.; Dombos, L.; Gothoskar, B. Sensitivity of Epstein-Barr Virus (EBV) Producer and Non-Producer Human Lymphoblastoid Cell Lines to Superinfection with EB-Virus. *Int. J. Cancer* **1972**, *10*, 44–57. [[CrossRef](#)]
38. Bernasconi, M.; Berger, C.; Sigrist, J.A.; Bonanomi, A.; Sobek, J.; Niggli, F.K.; Nadal, D. Quantitative Profiling of Housekeeping and Epstein-Barr Virus Gene Transcription in Burkitt Lymphoma Cell Lines Using an Oligonucleotide Microarray. *Virol. J.* **2006**, *3*, 43. [[CrossRef](#)]
39. Henderson, A.; Ripley, S.; Heller, M.; Kieff, E. Chromosome Site for Epstein-Barr Virus DNA in a Burkitt Tumor Cell Line and in Lymphocytes Growth-Transformed in Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1987–1991. [[CrossRef](#)]
40. Hinuma, Y.; Konn, M.; Yamaguchi, J.; Wudarski, D.J.; Blakeslee, J.R.; Grace, J.T. Immunofluorescence and Herpes-Type Virus Particles in the P3HR-1 Burkitt Lymphoma Cell Line. *J. Virol.* **1967**, *1*, 1045–1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Kawada, J.-I.; Ando, S.; Torii, Y.; Watanabe, T.; Sato, Y.; Ito, Y.; Kimura, H. Antitumor Effects of Duvelisib on Epstein-Barr Virus-Associated Lymphoma Cells. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1275–1284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Chelouah, S.; Cochet, E.; Couvé, S.; Balkaran, S.; Robert, A.; May, E.; Ogryzko, V.; Wiels, J. New Interactors of the Truncated EBNA-LP Protein Identified by Mass Spectrometry in P3HR1 Burkitt's Lymphoma Cells. *Cancers* **2018**, *10*, 12. [[CrossRef](#)]
43. Young, L.S.; Rickinson, A.B. Epstein-Barr Virus: 40 Years On. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4*, 757–768. [[CrossRef](#)]
44. Epstein, M.A.; Achong, B.G.; Barr, Y.M.; Zajac, B.; Henle, G.; Henle, W. Morphological and Virological Investigations on Cultured Burkitt Tumor Lymphoblasts (Strain Raji). *J. Natl. Cancer Inst.* **1966**, *37*, 547–559.
45. Decaussin, G.; Leclerc, V.; Ooka, T. The Lytic Cycle of Epstein-Barr Virus in the Nonproducer Raji Line Can Be Rescued by the Expression of a 135-Kilodalton Protein Encoded by the BALF2 Open Reading Frame. *J. Virol.* **1995**, *69*, 7309–7314. [[CrossRef](#)]
46. Hatfull, G.; Bankier, A.T.; Barrell, B.G.; Farrell, P.J. Sequence Analysis of Raji Epstein-Barr Virus DNA. *Virology* **1988**, *164*, 334–340. [[CrossRef](#)]
47. Coppo, P.; Gouilleux-Gruart, V.; Huang, Y.; Bouhlal, H.; Bouamar, H.; Bouchet, S.; Perrot, C.; Vieillard, V.; Dartigues, P.; Gaulard, P.; et al. STAT3 Transcription Factor Is Constitutively Activated and Is Oncogenic in Nasal-Type NK/T-Cell Lymphoma. *Leukemia* **2009**, *23*, 1667–1678. [[CrossRef](#)]
48. Zhang, Y.; Nagata, H.; Ikeuchi, T.; Mukai, H.; Oyoshi, M.K.; Demachi, A.; Morio, T.; Wakiguchi, H.; Kimura, N.; Shimizu, N.; et al. Common Cytological and Cytogenetic Features of Epstein-Barr Virus (EBV)-Positive Natural Killer (NK) Cells and Cell Lines Derived from Patients with Nasal T/NK-Cell Lymphomas, Chronic Active EBV Infection and Hydroa Vacciniforme-like Eruptions. *Br. J. Haematol.* **2003**, *121*, 805–814. [[CrossRef](#)]
49. Takahara, M.; Kis, L.L.; Nagy, N.; Liu, A.; Harabuchi, Y.; Klein, G.; Klein, E. Concomitant Increase of LMP1 and CD25 (IL-2-Receptor Alpha) Expression Induced by IL-10 in the EBV-Positive NK Lines SNK6 and KAI3. *Int. J. Cancer* **2006**, *119*, 2775–2783. [[CrossRef](#)]

50. Ishii, H.; Takahara, M.; Nagato, T.; Kis, L.L.; Nagy, N.; Kishibe, K.; Harabuchi, Y.; Klein, E. Monocytes Enhance Cell Proliferation and LMP1 Expression of Nasal Natural Killer/T-Cell Lymphoma Cells by Cell Contact-Dependent Interaction through Membrane-Bound IL-15. *Int. J. Cancer* **2012**, *130*, 48–58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hitt, M.M.; Allday, M.J.; Hara, T.; Karran, L.; Jones, M.D.; Busson, P.; Tursz, T.; Ernberg, I.; Griffin, B.E. EBV Gene Expression in an NPC-Related Tumour. *EMBO J.* **1989**, *8*, 2639–2651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Gilligan, K.J.; Rajadurai, P.; Lin, J.C.; Busson, P.; Abdel-Hamid, M.; Prasad, U.; Tursz, T.; Raab-Traub, N. Expression of the Epstein-Barr Virus BamHI a Fragment in Nasopharyngeal Carcinoma: Evidence for a Viral Protein Expressed in Vivo. *J. Virol.* **1991**, *65*, 6252–6259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Dambaugh, T.; Nkrumah, F.K.; Biggar, R.J.; Kieff, E. Epstein-Barr Virus RNA in Burkitt Tumor Tissue. *Cell* **1979**, *16*, 313–322. [[CrossRef](#)]
54. Verhoeven, R.J.A.; Tong, S.; Mok, B.W.-Y.; Liu, J.; He, S.; Zong, J.; Chen, Y.; Tsao, S.-W.; Lung, M.L.; Chen, H. Epstein-Barr Virus BART Long Non-Coding RNAs Function as Epigenetic Modulators in Nasopharyngeal Carcinoma. *Front Oncol* **2019**, *9*, 1120. [[CrossRef](#)]
55. Strong, M.J.; Xu, G.; Coco, J.; Baribault, C.; Vinay, D.S.; Lacey, M.R.; Strong, A.L.; Lehman, T.A.; Seddon, M.B.; Lin, Z.; et al. Differences in Gastric Carcinoma Microenvironment Stratify According to EBV Infection Intensity: Implications for Possible Immune Adjuvant Therapy. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003341. [[CrossRef](#)]
56. Marquitz, A.R.; Mathur, A.; Edwards, R.H.; Raab-Traub, N. Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI a Rightward Transcript Region. *J. Virol.* **2015**, *89*, 11256–11268. [[CrossRef](#)]
57. Marquitz, A.R.; Raab-Traub, N. The Role of MiRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin. Cancer Biol.* **2012**, *22*, 166–172. [[CrossRef](#)]
58. Al-Mozaini, M.; Bodelon, G.; Karstegl, C.E.; Jin, B.; Al-Ahdal, M.; Farrell, P.J. Epstein-Barr Virus BART Gene Expression. *J. Gen. Virol.* **2009**, *90*, 307–316. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Cai, X.; Schäfer, A.; Lu, S.; Bilello, J.P.; Desrosiers, R.C.; Edwards, R.; Raab-Traub, N.; Cullen, B.R. Epstein-Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed. *PLoS Pathog.* **2006**, *2*, e23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Zhu, J.Y.; Pfuhl, T.; Motsch, N.; Barth, S.; Nicholls, J.; Grässer, F.; Meister, G. Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal Carcinomas. *J. Virol.* **2009**, *83*, 3333–3341. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Fujii, K.; Yokoyama, N.; Kiyono, T.; Kuzushima, K.; Homma, M.; Nishiyama, Y.; Fujita, M.; Tsurumi, T. The Epstein-Barr Virus Pol Catalytic Subunit Physically Interacts with the BBLF4-BSLF1-BBLF2/3 Complex. *J. Virol.* **2000**, *74*, 2550–2557. [[CrossRef](#)]
62. Song, H.; Lim, Y.; Im, H.; Bae, J.M.; Kang, G.H.; Ahn, J.; Baek, D.; Kim, T.-Y.; Yoon, S.-S.; Koh, Y. Interpretation of EBV Infection in Pan-Cancer Genome Considering Viral Life Cycle: LiEB (Life Cycle of Epstein-Barr Virus). *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 3465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Kheir, F.; Zhao, M.; Strong, M.J.; Yu, Y.; Nanbo, A.; Flemington, E.K.; Morris, G.F.; Reiss, K.; Li, L.; Lin, Z. Detection of Epstein-Barr Virus Infection in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancers* **2019**, *11*, 759. [[CrossRef](#)]
64. Strong, M.J.; Laskow, T.; Nakhoul, H.; Blanchard, E.; Liu, Y.; Wang, X.; Baddoo, M.; Lin, Z.; Yin, Q.; Flemington, E.K. Latent Expression of the Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded Major Histocompatibility Complex Class I TAP Inhibitor, BNLF2a, in EBV-Positive Gastric Carcinomas. *J. Virol.* **2015**, *89*, 10110–10114. [[CrossRef](#)]
65. Jochum, S.; Moosmann, A.; Lang, S.; Hammerschmidt, W.; Zeidler, R. The EBV Immunoevasins VIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002704. [[CrossRef](#)]
66. Horst, D.; van Leeuwen, D.; Croft, N.P.; Garstka, M.A.; Hislop, A.D.; Kremmer, E.; Rickinson, A.B.; Wiertz, E.J.H.J.; Rensing, M.E. Specific Targeting of the EBV Lytic Phase Protein BNLF2a to the Transporter Associated with Antigen Processing Results in Impairment of HLA Class I-Restricted Antigen Presentation. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 2313–2324. [[CrossRef](#)]
67. Croft, N.P.; Shannon-Lowe, C.; Bell, A.I.; Horst, D.; Kremmer, E.; Rensing, M.E.; Wiertz, E.J.H.J.; Middeldorp, J.M.; Rowe, M.; Rickinson, A.B.; et al. Stage-Specific Inhibition of MHC Class I Presentation by the Epstein-Barr Virus BNLF2a Protein during Virus Lytic Cycle. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000490. [[CrossRef](#)]
68. Rojas, J.M.; Avia, M.; Martín, V.; Sevilla, N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J. Immunol. Res.* **2017**, *2017*, 6104054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Jog, N.R.; Chakravarty, E.F.; Guthridge, J.M.; James, J.A. Epstein Barr Virus Interleukin 10 Suppresses Anti-Inflammatory Phenotype in Human Monocytes. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 2198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Borozan, I.; Zapatka, M.; Frappier, L.; Ferretti, V. Analysis of Epstein-Barr Virus Genomes and Expression Profiles in Gastric Adenocarcinoma. *J. Virol.* **2018**, *92*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Hooykaas, M.J.G.; Kruse, E.; Wiertz, E.J.H.J.; Lebbink, R.J. Comprehensive Profiling of Functional Epstein-Barr Virus MiRNA Expression in Human Cell Lines. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Portis, T.; Longnecker, R. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A Mediates B-Lymphocyte Survival through Constitutive Activation of the Ras/PI3K/Akt Pathway. *Oncogene* **2004**, *23*, 8619–8628. [[CrossRef](#)]
73. Incrocci, R.; Barse, L.; Stone, A.; Vagvala, S.; Montesano, M.; Subramaniam, V.; Swanson-Mungerson, M. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) Enhances IL-10 Production through the Activation of Bruton's Tyrosine Kinase and STAT3. *Virology* **2017**, *500*, 96–102. [[CrossRef](#)]
74. Henderson, S.; Huen, D.; Rowe, M.; Dawson, C.; Johnson, G.; Rickinson, A. Epstein-Barr Virus-Coded BHRF1 Protein, a Viral Homologue of Bcl-2, Protects Human B Cells from Programmed Cell Death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 8479–8483. [[CrossRef](#)]

75. Altmann, M.; Hammerschmidt, W. Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis. *PLoS Biol.* **2005**, *3*. [[CrossRef](#)]
76. Bernhardt, K.; Haar, J.; Tsai, M.-H.; Poirey, R.; Feederle, R.; Delecluse, H.-J. A Viral MicroRNA Cluster Regulates the Expression of PTEN, P27 and of a Bcl-2 Homolog. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Yin, H.; Qu, J.; Peng, Q.; Gan, R. Molecular Mechanisms of EBV-Driven Cell Cycle Progression and Oncogenesis. *Med. Microbiol. Immunol.* **2019**, *208*, 573–583. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Bird, A.G.; McLachlan, S.M.; Britton, S. Cyclosporin A Promotes Spontaneous Outgrowth in Vitro of Epstein-Barr Virus-Induced B-Cell Lines. *Nature* **1981**, *289*, 300–301. [[CrossRef](#)]
79. Sculley, T.B.; Moss, D.J.; Hazelton, R.A.; Pope, J.H. Detection of Epstein-Barr Virus Strain Variants in Lymphoblastoid Cell Lines “spontaneously” Derived from Patients with Rheumatoid Arthritis, Infectious Mononucleosis and Normal Controls. *J. Gen. Virol.* **1987**, *68*, 2069–2078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. 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. The 2016 Revision of the World Health Organization Classification of Lymphoid Neoplasms. *Blood* **2016**, *127*, 2375–2390. [[CrossRef](#)]

Article 2 : Epstein-Barr Virus Transcriptome in Exosomes of Human Lymphoma Cell Lines

Comme présenté précédemment, l'EBV est associé à diverses tumeurs malignes. Après la primo-infection, le virus entre en latence en exprimant des protéines de latence (EBNA-1, -2, -3A, -3B, -3C, -LP, LMP-1, -2), les ARN EBER et BART ainsi que des miARN.

Les cellules ont la possibilité de communiquer entre elles en produisant une variété de vésicules extracellulaires, et plus particulièrement des exosomes. La présence d'exosomes dans le milieu extracellulaire a été reconnue dès la fin des années 1980. Cependant, les exosomes produits par les cellules ont d'abord été considérés comme des débris cellulaires résultant de lésions cellulaires, ou des sous-produits de l'homéostasie cellulaire, sans aucun effet significatif sur les cellules voisines. Ce n'est que récemment que ces vésicules extracellulaires se sont imposées comme des transporteurs fonctionnels d'une charge complexe de protéines, de lipides et d'acides nucléiques, capables de délivrer ces produits aux cellules réceptrices qu'ils rencontrent.

Les exosomes, petites vésicules sphériques liées à la membrane, transportent un grand nombre de molécules vers les cellules voisines. Par conséquent, les exosomes représentent une nouvelle voie de communication intercellulaire, qui peut jouer un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires, tels que la réponse immunitaire et la transduction des signaux.

Dans des contextes pathologiques, il a été proposé que les virus utilisent les exosomes sécrétés par les cellules qu'ils infectent pour transférer leurs matériaux génétiques et protéiques vers d'autres cellules, en modifiant la voie des exosomes de l'hôte pour leur propre intérêt. En général, les exosomes modifiés par les virus peuvent libérer des composants cellulaires et viraux de l'hôte dans les cellules voisines pour faciliter la diffusion des pathogènes, en évitant le système immunitaire. L'EBV, comme les autres virus, pourrait également utiliser les exosomes sécrétés des lymphocytes B infectés par l'EBV et contribuer ainsi à aggraver le développement et la dissémination de tumeurs.

La plupart des articles publiés sur les exosomes ont étudié les miARN viraux et humains et leurs rôles sur la cellule cible. Alors que les articles qui s'intéressent aux transcrits exosomaux sont peu fréquents et dans ce cas, ce sont les transcrits humains et non viraux qui sont étudiés.

Étant donné que les cellules tumorales infectées par l'EBV sécrètent des exosomes, il est donc important de découvrir le contenu de ces exosomes en transcrits viraux, messagers emportés vers d'autres cellules, afin de mieux comprendre le mécanisme qu'utilise ce virus dans le développement de cette maladie.

Les résultats publiés dans notre premier article nous ont incité à commencer la deuxième partie de notre projet, c'est-à-dire étudier par NGS l'expression des transcrits de l'EBV dans les exosomes sécrétés par des lignées. Les lignées qui ont été utilisées sont des lignées issues de lymphomes ainsi que des lignées lymphoblastoïdes humaines que nous avons établies. Les résultats ont été comparés à l'analyse des transcrits dans les cellules de ces mêmes lignées dans

le but de valider la présence des transcrits viraux dans les exosomes et de voir s'il existe une sélectivité ou non au niveau de ces transcrits empaquetés dans les exosomes.

Notre objectif final est d'analyser le transcriptome de l'EBV dans les exosomes secrétés dans les plasmas ou sérums des patients atteints de LAI sur lesquels nous avons déjà travaillé. L'étude sera intéressante pour comprendre le mécanisme qu'utilise l'EBV pour lutter contre notre système immunitaire, que ce soit inné ou adaptatif, dans la dissémination de la tumeur et éventuellement dans la résistance au traitement.

Dans l'étude présentée dans l'article 2, nous avons choisi des lignées cellulaires déjà étudiées au laboratoire pour l'étude du génome complet viral : la lignée B95.8 (référence), quatre lignées de lymphome de Burkitt (Jijoye, Raji, Namalwa, et P3HR1), deux de lymphome NK/T (Mec04 et SNK6) et quatre lignées lymphoblastoïdes LCL (COAN, DPL, Kreb2, and MLEB2).

Ces lignées ont été cultivées 3 jours consécutifs dans un milieu enrichi en sérum de veau foetal (SVF) ayant subi une déplétion en exosomes, afin que les exosomes contenus dans le SVF ne viennent pas contaminer ceux que nous étudions.

Après la culture cellulaire, les exosomes de ces lignées ont été recueillis et purifiés par deux méthodes différentes : l'ultracentrifugation ou le protocole Exo-Spin[®] kit (Cell Guidance Systems, USA). Concernant l'ultracentrifugation, les échantillons ont subi plusieurs centrifugation successives (300 xg, 10 min, et 16 000 xg, 30 min) en récupérant à chaque fois le surnageant et en éliminant le culot, dans laquelle se trouve les débris cellulaires, pour terminer par une ultracentrifugation de 120 000 xg pendant 1 heure où les exosomes sont récupérés dans le culot. Avec le protocole Exo-Spin, la précipitation et la chromatographie d'exclusion stérique (SEC) sont combinées pour isoler les exosomes. Puis l'ARN total a été extrait par RNeasy Mini[®] kit (Qiagen, Les Ulis, France).

Ces 2 méthodes, qui n'ont pas donné satisfaction entre nos mains, ont finalement été remplacées par le protocole exoRNeasy Maxi[®] kit (Qiagen, Les Ulis, France), qui est formé de deux parties : la première partie utilise une membrane permettant de récupérer les exosomes par une liaison d'affinité avec des marqueurs membranaires spécifiques aux exosomes ; elle est immédiatement suivie par la deuxième partie où l'ARN total est extrait en utilisant une membrane à base de silice. Une analyse de suivi des nanoparticules (NTA, *nanoparticle tracking analysis*) a été utilisée comme un contrôle pour déterminer la distribution de la taille et la concentration des exosomes. Cette analyse a été réalisée sur l'instrument NanoSight (Malvern Panalytical, Palaiseau, France).

La capture des transcrits spécifiques de l'EBV a ensuite été effectuée en utilisant les sondes spécifiques, selon le protocole détaillé dans les travaux déjà réalisés. Les bibliothèques ont été séquencées par NGS (sur MiSeq, Illumina) et analysées bioinformatiquement. Les lectures obtenues ont été alignées sur le génome de l'EBV-1, après élimination de celles hybridant sur le génome humain, et normalisées en calculant les transcrits par million pour illustrer une différence d'expression sous forme d'une carte de chaleur.

Nos résultats ont montré que les transcrits viraux étaient présents dans les exosomes des lignées cellulaires dans laquelle leur contenu en transcrits viraux ne traduit pas forcément le contenu cellulaire. Ainsi, un mécanisme actif a été mis en évidence avec un phénomène sélectif.

Epstein-Barr virus Transcriptome in Exosomes of Human Lymphoma Cell Lines

Nader Bayda¹, Valentin Tilloy², Jean Feuillard³, Arnaud Jaccard⁴, Sylvie Ranger-Rogez^{1,5,*}

¹ Microbiology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Faculty of Pharmacy, 87025 Limoges, France; nader.bayda@unilim.fr

² National Reference Center for Herpesviruses, Bioinformatics, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France; valentin.tilloy@unilim.fr

³ Biological Hematology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France; jean.feuilleard@unilim.fr

⁴ Clinical Hematology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, University Hospital Dupuytren, 87042 Limoges, France; arnaud.jaccard@unilim.fr

⁵ Virology Department, UMR CNRS 7276, INSERM U1262, Centre de Biologie Recherche et Santé, 87000 Limoges, France

* Correspondence: sylvie.rogez@unilim.fr

Abstract

The Epstein-Barr virus (EBV), a human gamma-herpes virus, is associated with several malignancies. EBV has the capacity to use exosomes in the development and propagation of neoplasms. Exosomes, small extracellular vesicles (EVs), represent a new intercellular communication pathway and may be involved in many cellular processes, such as immune response and signal transduction. The EBV transcripts in released exosomes are poorly characterized. RNA sequencing (RNA-seq) with a capture technique was performed to analyze EBV transcriptome in exosomes of 11 cell lines. The results were compared to the transcriptome of corresponding cells. The study included B95.8 (as reference), four Burkitt's lymphoma lines, two NK/T lymphoma lines, and four lymphoblastoid cell lines (LCLs). *BNLF2a* and *BKRF4* transcripts were present in predominance in exosomes of all cell lines. The corresponding proteins are implicated in immunoevasion, Transcripts of other genes, which encode proteins related to immunoevasion or cell proliferation, were also detected at significant levels in the exosomes of most cell lines. Taken together, EBV could transport its viral molecules *via* exosomes to reinforce its function in immune escape and its participation in oncogenesis.

Keywords: Epstein-Barr virus; EBV; exosomes; transcriptome; sequencing; RNA sequencing; RNA-seq; immune escape; oncogenesis

1. Introduction

Cells interact by secreting a wide range of extracellular vesicles (EVs), specifically exosomes (1–3). Under pathological situations, virus-infected tumor cells such as EBV-infected B cells can also create exosomes to their advantage (4,5).

The Epstein-Barr virus (EBV) is a human gamma-herpes virus that infects almost all adults worldwide. In primary infection, EBV penetrates epithelial cells first and then enters the lytic cycle, where more than 80 lytic genes are expressed to generate virus particles (6). Following primary infection, the virus enters a latent phase mainly in B cells and persists throughout life in the body without replication. A variety of severe cancers, including Burkitt's lymphoma (BL), nasopharyngeal carcinoma (NPC), Hodgkin's disease, B and T-cell lymphomas, gastric carcinoma, and infectious mononucleosis (IM), have been associated with the latent cycle of EBV (7). During this cycle, the EBV produces restricted viral proteins that determine the different forms of latency (8,9). Latency III, characterized by the expression of all the latent proteins as well as Bam-HI A rightward transcript (BARTs), Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBER-1 and -2), and miRNAs, is found in lymphoblastoid cell lines (LCLs), as well as in immunocompromised lymphomas (9–11). Latency II, observed in NK/T lymphoma (NK/TL), nasopharyngeal carcinoma (NPC), and Hodgkin's lymphoma (HL), presents the Epstein-Barr nuclear antigen protein EBNA-1 and the latent membrane proteins LMP-1, LMP-2A, and LMP-2B as well as the non-coding RNAs (9,12). Latency I, by the expression of only latent protein EBNA-1 as well as BARTs transcript, and the non-coding RNA EBERs, and miRNAs, is usually found in endemic BL biopsies, gastric carcinoma (GC), many derived BL cell lines, and in memory B cells during cell division (10). The lack of EBV latent proteins with the presence of EBER, BART, miRNAs, and maybe LMP-2A transcripts, defines latency 0. This latency is observed *in vivo* in resting memory B cells of healthy people (11).

Several recent studies have revealed that herpesviruses, such as EBV, exploit the host cell exosomal pathway to transfer virus-modified components into exosomes (13). Exosomes, small spherical EVs, have a diameter of 30-150 nm and are formed by the inward budding of the endosomal membrane and released by the fusing of multivesicular bodies (MVBs) and plasma membranes (14). These bioactive vesicles carried a wide range of viral proteins and nucleic acids (2,15). Most cell types release exosomes *in vitro* (16). It could be secreted from hematopoietic cells like B and T lymphocytes, and non-hematopoietic cells such as epithelial cells (17). They are also present naturally in body fluids such as serum and plasma (18,19). Exosome cargo characteristics vary depending on cell origin, although they contain many common protein components (20). Virus-modified exosomes incorporate with recipient cells and release their contents, which perform oncogenic biofunctions such as signal regulation, cell transformation, migration, and tumor angiogenesis. This transmission may also be effective for EBV to maintain a latent infection in the target cell (21).

The roles of exosomes in virus-associated cancers have recently gained much interest. Notably, the project on EBV and exosomes has made significant progress. Researchers have spent several years studying the expression of miRNAs in exosomes released by EBV-infected cells. However, because the EBV transcripts in released exosomes are poorly characterized, we propose

to identify by RNA-seq the whole transcriptome of EBV in the exosomes secreted from human lymphoma cell lines compared to the corresponding cells.

2. Materials and Methods

2.1. Cell lines

All cell lines utilized in this investigation have recently been characterized (22). Briefly, B95.8, as a reference, four BL lines (Jijoye, Raji, Namalwa, and P3HR1), two extranodal NK/T cell lymphoma lines (Mec04 and SNK6), and four lymphoblastoid cell lines (LCLs), COAN, DPL, Krb2, and MLEB2 were grown under normal conditions at 37°C in humidified 5% CO₂ incubators. All cell lines (80x10⁶ cells/50ml) were maintained for 72 hours in RPMI-1640 medium with glutaMAX (ThermoFisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France; catalog number 61870-010). The medium was supplemented with 10% exosome-depleted fetal bovine serum (FBS; Eurobio Scientific, Les Ulis, France; catalog number CVFSVF00-0U), 1% penicillin/gentamicin, and 100 U/mL of human IL-2 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France; catalog number I7908) for MEC04 and SNK6. Exosomes were depleted from FBS by ultracentrifugation at 120,000 xg for 16 h at 4°C, followed by filtration through 0.2 µm filters.

2.2. Exosomes enrichment and Nanoparticle tracking analysis (NTA)

At 72 hours of cell culture, the 50 ml of medium was harvested and centrifuged for 10 min at 300 ×g to remove cells. Exosomes were isolated from 15 ml of supernatant collected by using the exoEasy Maxi Kit (Qiagen, Les Ulis, France; catalog no. 76064) according to the manufacturer's protocol. Purified exosomes were resuspended in 400 µl XE buffer and diluted 1:200 for nanoparticle tracking analysis (NTA). The NTA used to determine both the size distribution and concentration of exosomes in liquid suspension was performed on a NanoSight NS300 instrument with a 488 nm laser (Malvern Panalytical, Palaiseau, France). Five videos, each lasting 60 seconds, were shot. The NTA 3.3 Dev Build 3.3.301 software (Malvern Instruments) was used to analyze the data, which was designed to first recognize and then track each vesicle on a frame-by-frame basis.

2.3. Total RNA extraction from exosomes of cell lines

The remaining 32 ml of supernatant collected was used to extract the total RNA from exosomes of cell lines via the exoRNeasy Maxi Kit (Qiagen, Les Ulis, France; catalog no. 77164) according to the manufacturer's protocol. Extracted RNA from exosomes was re-suspended in 14 µl RNase-free water. Exosomal RNA was then quantified and qualified using the NanoDrop™ One/One^C Microvolume UV-Vis Spectrophotometer and the Agilent RNA 6000 Nano Kit® (Agilent Technologies, Les Ulis, France; catalog no.5067-1511) on the Agilent 2100 Bioanalyzer™.

2.4. Libraries preparation and NGS sequencing

The libraries were prepared using the KAPA HyperCap Workflow v3 (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's protocol as previously described (22). The procedure contains, as part one, a poly(A) mRNA enrichment, and an EBV mRNA capture from the mRNA enriched. The cDNA libraries were prepared via the KAPA mRNA HyperPrep[®] (Roche, catalog number 08098115702). Briefly, Poly(A) mRNAs were first selected from high-quality total RNA using oligo(dT) beads. Then enriched mRNAs were fragmented by enzyme digestion, first and second cDNA strands were synthesized, and A-tailed. Afterward, the fragments were ligated overnight to the KAPA Universal adapter[®] (Roche, catalog number 09063781001). Ligated DNA fragments were purified, and amplified for 11 cycles with indexed primers (KAPA UDI Primer Mixes[®], Roche, catalog number 09134336001). The amplified libraries were then quantified with Qubit dsDNA HS Assay Kit[®] (Invitrogen, catalog number Q32854) and qualified with the High Sensitivity DNA kit[®] (Agilent Technologies, catalog number 5067-4626) on the Agilent 2100 Bioanalyzer. These libraries, pooled in equal molar quantities, were hybridized to EBV probes, detailed recently(22), at 47 °C for 72 hours using KAPA HyperCapture Reagent Kit[®] (Roche, catalog number 09075810001). At 72 hours, the hybridized cDNA fragments were captured by magnetic streptavidin beads from KAPA HyperCapture Bead kit[®] (Roche, catalog number 09075780001) and amplified for 14 cycles. To eliminate DNA fragments less than 200 bp, a single treatment of Pure Bead[®] was used during library preparation. 2x300-base paired-end sequencing was performed using an Illumina MiSeq instrument[™] (ICM, Paris, France).

2.5. NGS bioinformatics and statistical analysis

A quality check was performed on NGS data using FastQC v 0.11.5; no trimming was necessary. Raw reads were aligned against hg19 (Grch38.p13) and EBV-1 (NC_007605.1) reference genomes using bwa mem 0.7.17-r1188. Data were then quantified using featureCounts 1.6.0. Samtools 1.15.1 was used to estimate mean depth.

Data normalization and differential expression analysis were performed as described in Bayda N *et al.* (22). We here compared results with previously described human cell lines (22) for latency genes and both latency and lytic genes.

EBNA-LP gene and EBNA-LP Y1-Y2 exon were extracted from NC_007605.1 reference using bedtools 2.30.0. Those regions were then aligned against reads using bwa 0.7.17-r1188, compressed and sorted using samtools 1.13 (view and sort) and mean depth was obtained using samtools depth associated to a awk custom command.

2.6. Accession number

Sequence read data from this study has been submitted to SRA and are available under BioProject ID PRJNA686869.

3. Results

3.1. Profile of the EBV transcriptome using the Illumina platform

In this work, we study the EBV transcriptome in the exosome of 11 EBV-positive human cell lines, which included B95-8, 4 BL lines, 2 extranodal NK/T cell lymphoma lines, as well as 4 LCLs using the Illumina platform. New Generation Sequencing (NGS) results showed that the read number per sample had a range between 113,476 and 9,096,168 (mean read number 3,810,983) with a mean depth of 939 (comprised between 110.5 and 2,894.1) (**Table 1**).

Table 1. Results obtained for EBV transcriptome by Illumina platform for exosomes of 11 cell lines.

Sample Name	Reads Number	Mean Depth	Reference
B95.8.e	9,096,168	2,894.1	EBV-1
COAN.e	1,784,302	1,269.3	EBV-1
DPL.e	1,578,832	826.1	EBV-1
Jijoye.e	6,816,138	2,741.0	EBV-1
Kreb2.e	1,128,677	916.5	EBV-1
Mec04.e	132,420	240.5	EBV-1
MLEB2.e	2,881,521	1,568.6	EBV-1
Namalwa.e	113,476	110.5	EBV-1
P3HR1.e	2,822,854	1,672.3	EBV-1
Raji.e	162,352	154.0	EBV-1
SNK6.e	1,113,908	835.1	EBV-1

3.2. Isolation and Characterization of Exosomes

Before libraries preparation, exosomes were isolated from the cell lines and confirmed using the NanoSight NS300 instrument. Sizing and quantification of exosomes were performed on one cell line from each category: B95.8, Namalwa, SNK6, and DPL (**Figure 1**). We demonstrated that the most of particles had the size of exosomes (between 30-150 nm), with very high concentrations, 1.27 E10, 0.76 E10, 0.84 E10, and 1.41 E10 exosomes/ml for B95.8, Namalwa, SNK6, and DPL, respectively.

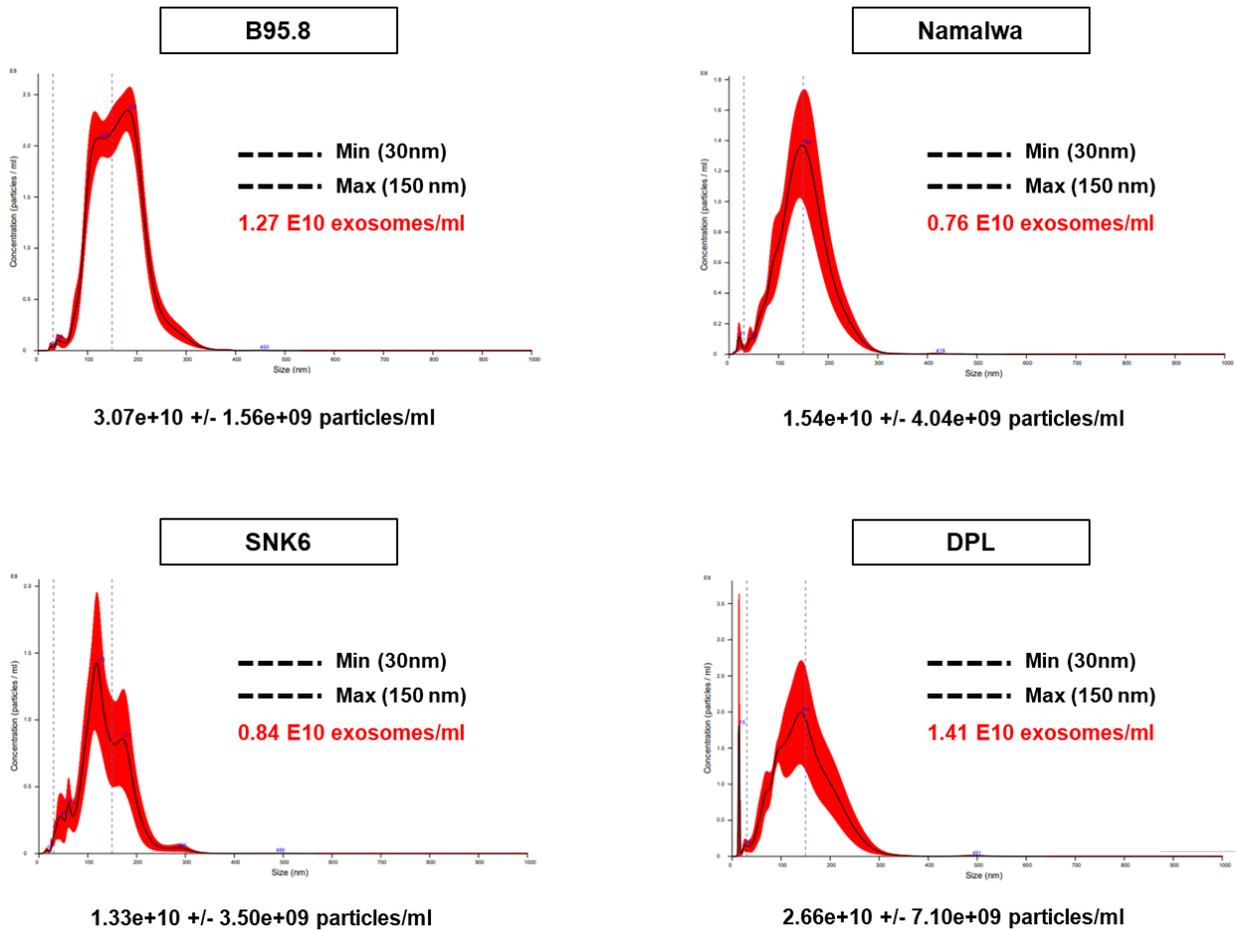


Figure 1. Results from NanoSight analysis of extracellular vesicles purified from human cell lines.

3.3. EBV transcripts Are Present in Exosomes of Cell Lines

The viral transcripts were clearly present in exosomes, in a variable degree between cell lines (**Figure 2**). We can highlight that a group of genes including latency gene, *EBNA-LP*, and 23 lytic genes were observed in most exosomes of cell lines. Among the lytic genes, It looks like a group of genes that encode viral glycoproteins, including *BLLF1* (gp350-220), *BALF4* (*gB*), *BXLF2* (*gH*), *BKRF2* (*gL*), *BZLF2* (*gp42*), *BBRF3* (*gM*), *BLRF2* (*gN*), *BMRF2*, *BDLF2*, *BDLF3*, *BILF2*, *BILF1*, *BARF1* was present in the majority of exosomes of cell lines, P3HR1, SNK6, COAN, MLEB2, Jijoye, Krebs2, B95.8, and more weakly Namalwa (8/11). In contrast, another group of genes comprised latency genes (*EBNA-2* and *EBNA-3B*) and lytic genes (*BOLF1*, *BHLF1*, *BPLF1* and *BWRF1.1/1.4/1.7/1.3/1.5/1.2/1.6/1.8*) were not expressed at all in exosomes of 6 cell lines.

It was also notable that *BNLF2a* and *BKRF4* transcripts were found at high levels in the exosomes of each line. Similarly, the exosomes of all cell lines contained *BMRF1*, *BSLF2/BMLF1*,

BHLF1, *BALF1*. Interestingly, a cluster of *BWRF1* genes (*BWRF1.1*, *BWRF1.2*, *BWRF1.3*, *BWRF1.4*, *BWRF1.5*, and *BWRF1.8*) was not expressed in these exosomes.

Significantly, most of the cell lines (Namalwa, Mec04, P3HR1, COAN, DPL, MLEB2, and Krb2) transfer via exosomes, at a strong rate, a gene cluster comprised the following: *BARF0*, *A73*, *EBNA-3B*, *EBNA-LP*, and 10 lytic genes. Instead, three lines (Raji, Jijoye, and SNK6) have a gene cluster consisting of 2 latency genes (*EBNA-2* and *RPMS1*) and 12 lytic genes overexpressed at the cellular level compared to the exosomal content.

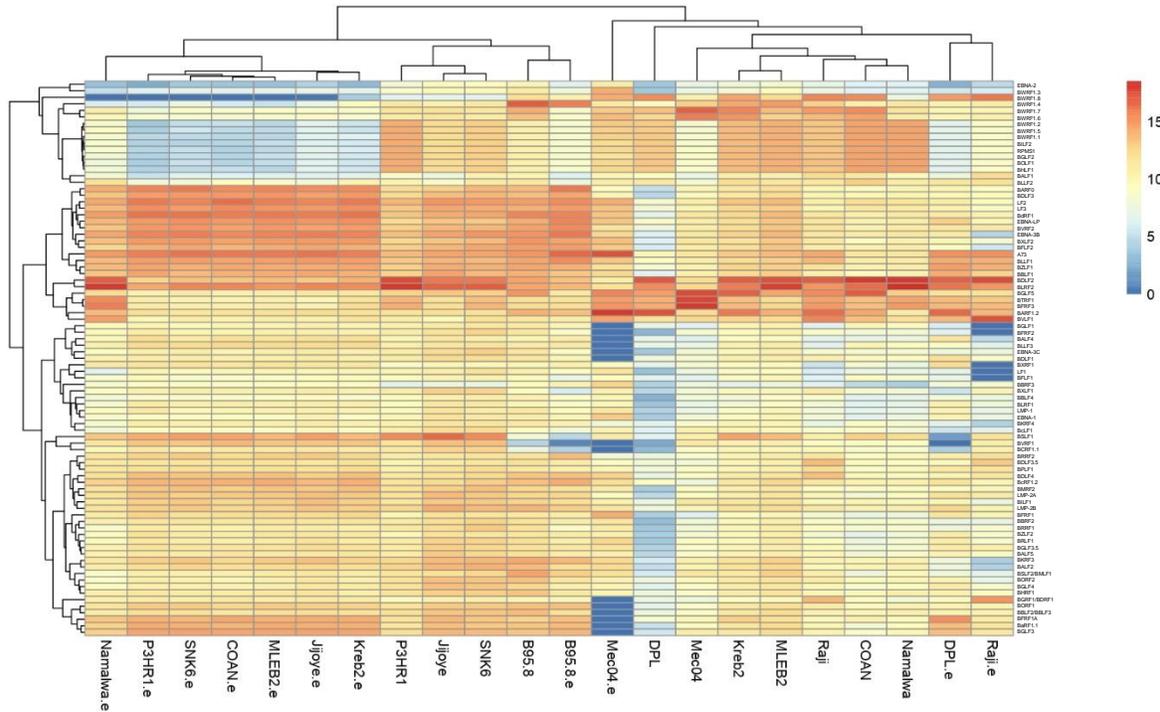


Figure 3. Heatmap of all EBV gene expression for human cell lines and their exosomes.

3.5. Strong Expression of Truncated *EBNA-LP* Isoforms in Exosomes

To reveal the presence of a truncated form of *EBNA-LP* in cell lines, we aligned sequences obtained against the Y1Y2 exons of *EBNA-LP* and the complete sequence of the same gene. The mean depth was then estimated (**Table 2**).

We demonstrated that the truncated form, without *EBNA-LP* Y1-Y2 exon, was frequently detected in exosomes (7/11) than in cells (4/11). This form was observed in exosomes of COAN, Jijoye, Krb2, MLEB2, Namalwa, P3HR1, and SNK6. So, the forms selected by the exosomes being the truncated forms, independent of the origin of the cell line (BL, NK/TL, LCL).

Table 2. Results obtained for *EBNA-LP* gene and his truncated form (EBNA-LP Y1-Y2 exon) by new generation sequencing (NGS) for the 11 cell lines and their exosomes.

Sample Name	Mean Depth	
	EBNA-LP Y1Y2	all EBNA-LP
B95.8.e	3864.8	5306.3
COAN.e	0.0	1154.8
DPL.e	13944.6	7994.1
Jijoye.e	1.0	4204.2
Kreb2.e	7.3	1020.0
Mec04.e	100.0	250.9
MLEB2.e	0.0	2189.8
Namalwa.e	0.0	681.1
P3HR1.e	0.0	1259.3
Raji.e	1887.3	1125.9
SNK6.e	0.0	758.9
B95.8	3100.9	3250.9
COAN	14124.0	16048.0
DPL	38643.7	22863.6
Jijoye	8.8	2837.7
Kreb2	831.7	2295.3
Mec04	1400.2	1200.1
MLEB2	565.6	4458.8
Namalwa	23.0	14014.0
P3HR1	5.4	6218.6
Raji	830.0	443.3
SNK6	8.7	4142.8

4. Discussion

In this study, we analyzed the expression of EBV transcripts in exosomes released from human cell lines compared to EBV transcripts in the same cell lines. The results of viral transcript in the cell lines were previously published (22).

The first observation to be considered was that viral transcripts were clearly present in exosomes, although in a variable proportion depending on the cell lines. However, we can also notice the viral transcript composition of exosomes was not related to the origin of the cell, while

we could have expected a similar transcriptome. For example, the findings were very different between SNK6 and Mec04, which are NK cells, or between different Burkitt cells. Regarding exosomes, the transcriptome was quite similar for the B95.8, Jijoye, P3HR1, SNK6, and Namalwa lines and the LCLs (Kreb2, MLEB2, COAN), whereas DPL, Raji, and Mec04 had different profiles. In addition, for some lines, it seemed that EBV transcripts were transferred into exosomes by an active mechanism with a selective phenomenon. For instance, *A73* transcript in Mec04 was highly expressed in exosomes while it was much less present in cells (**Figure 3**). In contrast, *BOLF2* and *BLRF2* were highly expressed in P3HR1 cells while found much less in the corresponding exosomes.

Upon examination of the transcriptome of exosomes (**Figure 2**), it was notable that many of the most expressed transcripts play a role in immunoevasion, either in the innate immune system, *via* different and complementary mechanisms, or in the adaptive immune system. It is clear that the first message delivered to the recipient cell is a protective response against host immunity.

Thus, the early lytic gene *BNLF2a* and the tegument gene *BKRF4* were highly predominant in exosomes of each cell line, suggesting that were carried from the infected tumor cell to other cells. The corresponding proteins, BNLF2a and BKRF4, seem to play a fundamental role, due to the transcript expression level and their presence in the exosomes of each cell line. Indeed, BNLF2a protein downregulates HLA class I proteins by inhibiting the binding of peptides and ATP to the transporter activated peptide (TAP), thus blocking antigenic presentation to cytotoxic T lymphocytes (23,24). In a different way, BKRF4 limits nucleosome assembly to suppress antiviral responses (25).

Another group of transcripts was found at high levels in the exosomes of 8/11 lines, namely P3HR1, SNK6, COAN, MLEB2, Jijoye, Kreb2, B95.8, and more weakly Namalwa. Certain transcripts also code for proteins involved in the innate immune system. For instance, the *BLRF2* transcripts, encode a tegument protein that inhibits the host innate immunity by targeting cGAS enzyme activity, the main cytosolic DNA sensor used to detect viral DNA invasion (26). In addition, BGLF5 downregulates the level of Toll-like receptor 9 (TLR9) (27), a receptor able to recognize the DNA of many pathogens and therefore able to detect the presence of EBV. Moreover, BGLF5 acts as a cytoplasmic RNA endonuclease by inducing the degradation of the majority of cellular mRNAs resulting in the inhibition of cellular protein synthesis and thus allowing evasion of the host immune response (28). Regarding innate immunity, the tegument protein BGLF2 can bind to the Tyk2 protein of the type I interferon signaling pathway, thereby inhibiting the host defense response and promoting the reactivation of a latent virus (Type I interferon prevents viral reactivation) (29). Finally, early lytic protein BORF2, a large subunit of the EBV ribonucleotide reductase, binds to the catalytic domain of APOBEC3B protein and inhibits this antiviral enzyme. BORF2 protein also mediates the relocalization of nuclear APOBEC3B into perinuclear bodies (30). As to the BSLF2/BMLF1 complex, it can inhibit the cell to establish an antiviral state, by acting as an alternative splicing factor for cellular RNAs such as *STAT1*, leading to a *STAT1* mRNA unable to produce the STAT1 α isoform (31). All of these transcripts were present in abundance in the exosomes of most cell lines.

A few other transcripts protect EBV against the adaptive immune system, as does BNL2a. In this way, the tegument protein BDLF3 alters CD8+ recognition by targeting MHC class I molecules on the surface of T cells for ubiquitination and proteasome-dependent downregulation. Interestingly, BDLF3 targets MHC class II molecules to alter CD4+ T cell recognition (32).

Among the highly expressed transcripts in exosomes, we found transcripts of proteins presumably involved in oncogenesis. Unexpectedly, *EBNA-LP* transcripts were highly present in exosomes of all cell lines except Mec04, although *EBNA-2* transcripts were globally almost absent. A negative selection seemed to be exerted on *EBNA-2* transcripts, which were less present in exosomes than in the corresponding cells. In contrast, *EBNA-LP* transcripts were much more concentrated in exosomes than in cells, indicating a positive selection. The main role of EBNA-LP is as a coactivator of *EBNA-2* transcriptional activity. It is known that in some Burkitt's lymphomas, EBNA-2 is not expressed, as well as the Y1Y2 exons of *EBNA-LP* (atypical latency program Wp). This is found in the P3HR1 cell line. This truncated form of EBNA-LP makes the cells more resistant to apoptosis (33). It was interesting to notice in our work that this truncated form was found significantly more frequent in exosomes (7/11) than in cells (4/11), the forms selected by the exosomes being the truncated forms, independent of the origin of the cell line (BL, NK/TL, LCL). These truncated forms will be transferred to the recipient cells, making them more resistant to apoptosis. EBNA-LP can also exert its oncogenic character by binding to cellular proteins such as tumor suppressors or proteins involved in the apoptosis or the cell cycle (34). Similar to EBNA-LP, BMRF1 transcripts were present in relatively large amounts in all exosomes studied. BMRF1 protein is involved in oncogenesis through its ability to inhibit the response to host DNA damage, such as DNA double-strand breaks (35). Other transcripts present in high levels in most exosomes code for proteins described to participate in oncogenesis, such as *BLLF1* where expression has been reported in DLBCL (36) or *BRRF3* described as involved in gastric cancers (37). *BORF2* transcripts were also among the transcripts found in abundance in most exosomes. BORF2 protein binds to and inhibits p53, allowing G1/S cell cycle (38). Finally, *BHRF1* transcripts were found among the most commonly expressed in exosomes. *BHRF1* is constitutively expressed at high levels in transformed cells *in vitro* (22). This gene is expressed during the latent phase as well as during the lytic cycle. BHRF1 has been demonstrated to strongly protect cells against apoptosis by binding, as vBcl2, to cellular proteins PUMA, BIM, BID, and BAK (39). The capacity of BHRF1 to inhibit apoptosis could also be related to its plasticity. The high expression of BHRF1 allows tumor cell persistence.

In addition to transcripts of proteins involved in immunoevasion or oncogenesis, the most predominant transcripts by far, several other highly expressed transcripts were also present, but their existence is more difficult to explain. They included, for example, transcripts of proteins involved in transport (especially nuclear transport), such as *BFRF3* (40), *BLRF1* (41), *BLLF2* (42) and/or intercellular diffusion (*BDLF2*) (43), transcripts of capsid proteins (*BVRF2*, *BdRF1*) (44,45), transcripts of entry glycoproteins (*BXLF2*, *BALF4*) (46,47), or transcripts of proteins with unknown function (*BILF2*, *BRRF2*) (48).

Lastly, exosomes derived from Mec04, Raji, DPL, and Namalwa were different from the others: they expressed little or none of the above transcripts but, in contrast, the transcripts *LMP-*

1, *EBNA-1*, *LMP-2A*, and *LMP-2B*, and *EBNA-2* for Mec04, Raji and DPL, were abundantly present. At least, the first three of these transcripts and *EBNA-2* can participate in lymphomagenesis. LMP-1 can constitutively induce the cell activation pathways NF- κ B, c-Jun amino-terminal Kinase (JNK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), P38, and Janus Activated Kinase / signal transducer and activator of transcription proteins (JAK/STAT) (49). EBNA-1 can regulate the cell cycle by regulating cyclin D1 expression, cell migration by regulating Chemokine Ligand 3 (CCL3) and Chemokine Ligand 4 (CCL4) chemokines expression (50), and apoptosis by increasing the expression of an anti-apoptotic protein, survivin (51). LMP-2A inhibits B-Cell Receptor (BCR) signaling and prevents the transition from the latent phase to the lytic cycle, which is normally induced by BCR signaling. Its ability to induce the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway provides a survival signal to B lymphocytes, allowing them to avoid apoptosis in the absence of selection in germinal centers. It can also constitutively activate the RAS oncogene, thereby promoting B cell proliferation and survival (52). EBNA-2 initiates and maintains B cell immortalization through interaction with chromatin remodelers and as a cofactor of transcription factors (53).

5. Conclusions

In conclusion, there are viral transcripts in exosomes of infected cells independently of the cell type. Some transcripts were concentrated in the exosomes compared to their corresponding cell type. The most abundant transcripts are involved in immunoevasion and oncogenesis. After this study on cell lines, it will be very interesting to analyse the transcripts present in exosomes from patients.

Funding: This work was supported by grants provided by the “Ligue contre le Cancer (Comité Haute-Vienne and Comité Creuse)”.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in the article. EBV gene expression data generated in this study have been deposited as stated above (Section 2.6).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Mittelbrunn M, Sánchez-Madrid F. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 May 18;13(5):328–35. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrm3335>
2. Schorey JS, Bhatnagar S. Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology. *Traffic* [Internet]. 2008 Jun;9(6):871–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x>
3. van Niel G, D’Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018 Apr 17;19(4):213–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

4. Minciacchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular Vesicles in Cancer: Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2015 Apr;40:41–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952115000373>
5. Gill S, Catchpole R, Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2019 May 1;43(3):273–303. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/43/3/273/5195520>
6. Mckenzie J, El-Guindy A. Epstein-Barr virus lytic cycle reactivation. In: *Current Topics in Microbiology and Immunology* [Internet]. 2015. p. 237–61. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-22834-1_8
7. Kutok JL, Wang F. SPECTRUM OF EPSTEIN-BARR VIRUS–ASSOCIATED DISEASES. *Annu Rev Pathol Mech Dis* [Internet]. 2006 Feb;1(1):375–404. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209>
8. Rasul AE, Nagy N, Sohlberg E, Ádori M, Claesson H, Klein G, et al. Simultaneous detection of the two main proliferation driving EBV encoded proteins , EBNA-2 and LMP-1 in single B cells. *J Immunol Methods* [Internet]. 2012;385(1–2):60–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2012.08.008>
9. Grywalska E, Rolinski J. Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomas. *Semin Oncol* [Internet]. 2015;42(2):291–303. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2014.12.030>
10. Kang M-S, Kieff E. Epstein–Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* [Internet]. 2015 Jan 23;47(1):e131–e131. Available from: www.nature.com/emm
11. Marques-Piubelli ML, Salas YI, Pachas C, Becker-Hecker R, Vega F, Miranda RN. Epstein–Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review. *Pathology* [Internet]. 2020 Jan;52(1):40–52. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0031302519303964>
12. Hutchings IA, Tierney RJ, Kelly GL, Stylianou J, Rickinson AB, Bell AI. 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*. 2006;80(21):10700–11.
13. Zheng J, Shi Y, Feng Z, Zheng Y, Li Z, Zhao Y, et al. Oncogenic effects of exosomes in γ -herpesvirus-associated neoplasms. *J Cell Physiol* [Internet]. 2019 Nov 2;234(11):19167–79. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.28573>
14. Gill S, Catchpole R, Forterre P. Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond. *FEMS Microbiol Rev* [Internet]. 2019 May 1;43(3):273–303. Available from: <https://academic.oup.com/femsre/article/43/3/273/5195520>
15. Zhou Y, Xia L, Lin J, Wang H, Oyang L, Tan S, et al. Exosomes in Nasopharyngeal Carcinoma. *J Cancer* [Internet]. 2018;9(5):767–77. Available from: <http://www.jcancer.org/v09p0767.htm>
16. Vlassov A V., Magdaleno S, Setterquist R, Conrad R. Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2012 Jul;1820(7):940–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416512000906>
17. Caby M-P, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* [Internet]. 2005 Jul 1;17(7):879–87. Available from: <http://academic.oup.com/intimm/article/17/7/879/675097/Exosomal-like-vesicles-are-present-in-human-blood>

18. Lässer C, Seyed Alikhani V, Ekström K, Eldh M, Torregrosa Paredes P, Bossios A, et al. Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages. *J Transl Med* [Internet]. 2011 Dec 14;9(1):9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21235781>
19. Tang Y-T, Huang Y-Y, Zheng L, Qin S-H, Xu X-P, An T-X, et al. Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum. *Int J Mol Med* [Internet]. 2017 Sep;40(3):834–44. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.2017.3080>
20. Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, et al. Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J Immunol* [Internet]. 2001 Jun 15;166(12):7309–18. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.166.12.7309>
21. Meckes DG, Gunawardena HP, Dekroon RM, Heaton PR, Edwards RH, Ozgur S, et al. Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2013 Jul 30;110(31). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1303906110>
22. Bayda N, Tilloy V, Chaunavel A, Bahri R, Halabi MA, Feuillard J, et al. Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2021 Feb 4;13(4):610. Available from: <https://www.mdpi.com/2072-6694/13/4/610>
23. Jochum S, Moosmann A, Lang S, Hammerschmidt W, Zeidler R. The EBV Immuno-evasins vIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination. Stevenson PG, editor. *PLoS Pathog* [Internet]. 2012 May 17;8(5):e1002704. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1002704>
24. Horst D, van Leeuwen D, Croft NP, Garstka MA, Hislop AD, Kremmer E, et al. Specific Targeting of the EBV Lytic Phase Protein BNLF2a to the Transporter Associated with Antigen Presentation Results in Impairment of HLA Class I-Restricted Antigen Presentation. *J Immunol* [Internet]. 2009 Feb 15;182(4):2313–24. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0803218>
25. Chen J, Lu Z, Gong W, Xiao X, Feng X, Li W, et al. Epstein-Barr virus protein BKRF4 restricts nucleosome assembly to suppress host antiviral responses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2022 Sep 13;119(37). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2203782119>
26. Xu G, Liu C, Zhou S, Li Q, Feng Y, Sun P, et al. Viral tegument proteins restrict cGAS-DNA phase separation to mediate immune evasion. *Mol Cell* [Internet]. 2021 Jul;81(13):2823–2837.e9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276521003592>
27. van Gent M, Griffin BD, Berkhoff EG, van Leeuwen D, Boer IGJ, Buisson M, et al. EBV Lytic-Phase Protein BGLF5 Contributes to TLR9 Downregulation during Productive Infection. *J Immunol* [Internet]. 2011 Feb 1;186(3):1694–702. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.0903120>
28. Feederle R, Bannert H, Lips H, Müller-Lantzsch N, Delecluse H-J. The Epstein-Barr Virus Alkaline Exonuclease BGLF5 Serves Pleiotropic Functions in Virus Replication. *J Virol* [Internet]. 2009 May 15;83(10):4952–62. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00170-09>
29. Liu X, Sadaoka T, Krogmann T, Cohen JI. Epstein-Barr Virus (EBV) Tegument Protein BGLF2 Suppresses Type I Interferon Signaling To Promote EBV Reactivation. Longnecker RM, editor. *J Virol* [Internet]. 2020 May 18;94(11). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00258-20>

30. Cheng AZ, Yockteng-Melgar J, Jarvis MC, Malik-Soni N, Borozan I, Carpenter MA, et al. Epstein–Barr virus BORF2 inhibits cellular APOBEC3B to preserve viral genome integrity. *Nat Microbiol* [Internet]. 2019 Jan 12;4(1):78–88. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41564-018-0284-6>
31. Verma D, Swaminathan S. Epstein-Barr Virus SM Protein Functions as an Alternative Splicing Factor. *J Virol* [Internet]. 2008 Jul 15;82(14):7180–8. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00344-08>
32. Quinn LL, Williams LR, White C, Forrest C, Zuo J, Rowe M. The Missing Link in Epstein-Barr Virus Immune Evasion: the BDLF3 Gene Induces Ubiquitination and Downregulation of Major Histocompatibility Complex Class I (MHC-I) and MHC-II. Frueh K, editor. *J Virol* [Internet]. 2016 Jan;90(1):356–67. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02183-15>
33. Garibal J, Hollville E, Bell AI, Kelly GL, Renouf B, Kawaguchi Y, et al. Truncated Form of the Epstein-Barr Virus Protein EBNA-LP Protects against Caspase-Dependent Apoptosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A. *J Virol* [Internet]. 2007 Jul 15 [cited 2022 Sep 20];81(14):7598–607. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.02435-06>
34. Ranger-Rogez S. EBV Genome Mutations and Malignant Proliferations. In: Intech [Internet]. 2021. p. 225–40. Available from: <https://www.intechopen.com/books/advanced-biometric-technologies/liveness-detection-in-biometrics>
35. Salamun SG, Sitz J, De La Cruz-Herrera CF, Yockteng-Melgar J, Marcon E, Greenblatt J, et al. The Epstein-Barr Virus BMRF1 Protein Activates Transcription and Inhibits the DNA Damage Response by Binding NuRD. Longnecker RM, editor. *J Virol* [Internet]. 2019 Nov 15;93(22). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01070-19>
36. Cohen M, Narbaitz M, Metrebian F, De Matteo E, Preciado M V., Chabay PA. Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients. *Int J Cancer* [Internet]. 2014 Dec 15;135(12):2816–24. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ijc.28942>
37. Yao Y, Xu M, Liang L, Zhang H, Xu R, Feng Q, et al. Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus identifies variants and genes associated with gastric carcinoma and population structure. *Tumor Biol* [Internet]. 2017 Oct 15;39(10):101042831771419. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/1010428317714195>
38. Yockteng-Melgar J, Shire K, Cheng AZ, Malik-Soni N, Harris RS, Frappier L. G 1 /S Cell Cycle Induction by Epstein-Barr Virus BORF2 Is Mediated by P53 and APOBEC3B. Goodrum F, editor. *J Virol* [Internet]. 2022 Sep 28;96(18). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jvi.00660-22>
39. Fitzsimmons L, Cartlidge R, Chang C, Sejc N, Galbraith LCA, Suraweera CD, et al. EBV BCL-2 homologue BHRF1 drives chemoresistance and lymphomagenesis by inhibiting multiple cellular pro-apoptotic proteins. *Cell Death Differ* [Internet]. 2020 May 23;27(5):1554–68. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41418-019-0435-1>
40. Wang W-H, Kuo C-W, Chang L-K, Hung C-C, Chang T-H, Liu S-T. Assembly of Epstein-Barr Virus Capsid in Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies. Longnecker RM, editor. *J Virol* [Internet]. 2015 Sep;89(17):8922–31. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.01114-15>
41. Lake CM, Hutt-Fletcher LM. Epstein-Barr Virus That Lacks Glycoprotein gN Is Impaired in Assembly and Infection. *J Virol* [Internet]. 2000 Dec;74(23):11162–72. Available from:

<https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.74.23.11162-11172.2000>

42. Li J, Guo Y, Deng Y, Hu L, Li B, Deng S, et al. Subcellular Localization of Epstein–Barr Virus BLLF2 and Its Underlying Mechanisms. *Front Microbiol* [Internet]. 2021 Jul 22;12(July):1–16. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2021.672192/full>
43. Gore M, Hutt-Fletcher LM. The BDLF2 protein of Epstein–Barr virus is a type II glycosylated envelope protein whose processing is dependent on coexpression with the BMRF2 protein. *Virology* [Internet]. 2009 Jan;383(1):162–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682208006612>
44. Sugimoto A. Replication Compartments—The Great Survival Strategy for Epstein–Barr Virus Lytic Replication. *Microorganisms* [Internet]. 2022 Apr 25;10(5):896. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/10/5/896>
45. Fachiroh J, Stevens SJC, Haryana SM, Middeldorp JM. Combination of Epstein–Barr virus scaffold (BdRF1/VCA-p40) and small capsid protein (BFRF3/VCA-p18) into a single molecule for improved serodiagnosis of acute and malignant EBV-driven disease. *J Virol Methods* [Internet]. 2010 Oct;169(1):79–86. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093410002326>
46. Matsuura H, Kirschner AN, Longnecker R, Jardetzky TS. Crystal structure of the Epstein-Barr virus (EBV) glycoprotein H/glycoprotein L (gH/gL) complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(52):22641–6.
47. Hong J, Wei D, Zhong L, Wu Q, Chen K, Zhang W, et al. Glycoprotein B Antibodies Completely Neutralize EBV Infection of B Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2022 May 27;13(May):1–14. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2022.920467/full>
48. Hutt-Fletcher LM. EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virol* [Internet]. 2015 Oct;10(10):1155–62. Available from: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fvl.15.80>
49. Saha A, Robertson ES. Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. Goodrum F, editor. *J Virol* [Internet]. 2019 Jul;93(13). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/JVI.00238-19>
50. Lu F, Wikramasinghe P, Norseen J, Tsai K, Wang P, Showe L, et al. Genome-wide analysis of host-chromosome binding sites for Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1). *Virol J*. 2010;7:1–17.
51. Frappier L. Role of EBNA1 in NPC tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* [Internet]. 2012 Apr;22(2):154–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1044579X11001039>
52. El-Sharkawy A, Al Zaidan L, Malki A. Epstein–Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Front Oncol* [Internet]. 2018 Aug 2;8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00265/full>
53. Lu F, Chen H-S, Kossenkov A V., DeWispeleare K, Won K-J, Lieberman PM. EBNA2 Drives Formation of New Chromosome Binding Sites and Target Genes for B-Cell Master Regulatory Transcription Factors RBP-jk and EBF1. Flemington EK, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2016 Jan 11;12(1):e1005339. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1005339>

Chapitre IV : Discussion générale

Chapitre IV : Discussion générale

Le LAI représente la forme la plus courante de lymphome périphérique à cellules T (15-20% des PTCL). Il touche en priorité les personnes âgées et constitue un lymphome agressif de mauvais pronostic (Federico *et al.*, 2013). Ce lymphome, bien que rare, est plus fréquent en Europe que dans d'autres parties du monde (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

L'EBV est associé dans plus de 90 % des cas au LAI. Il se trouve souvent dans les cellules immunoblastiques B qui ressemblent aux cellules B de HRS et occasionnellement dans les lymphocytes T néoplasiques (Chiba and Sakata-Yanagimoto, 2020).

Les recherches sur la relation entre l'EBV et le LAI sont encore limitées et il est difficile de savoir quel rôle joue le virus dans cette pathologie. Plusieurs chercheurs estiment que l'EBV est la cause principale du lymphome LAI et que l'initiation de la croissance des cellules T pouvait être attribuée à un antigène. A l'inverse, d'autres pensent qu'il n'est pas impliqué dans la lymphomagenèse mais que sa présence est un phénomène secondaire causé par la déficience immunitaire induite par le LAI, provoquant la réactivation virale (Lammoglia Cobo *et al.*, 2022).

A ce titre, notre laboratoire a séquencé le génome complet de l'EBV chez des patients atteints de LAI. Deux souches virales principales ont été mises en évidence dans les LAI, dont l'une présente les deux mutations *BNRF1* S542N et *BZLF1* A206S ainsi que des mutations sur les gènes *EBNA-3* et *LMP-2*. Cette souche a été essentiellement trouvée chez des patients ayant une courte survie après le diagnostic. Les mutations les plus importantes dans les LAI ont été retrouvées sur les gènes de latence ou de tégument. De plus, le virus était clonal dans tous les prélèvements de LAI, ce qui suggère qu'il peut être impliqué dans cette pathologie. Enfin, ce virus était présent en phase de latence dans tous les LAI.

Mais ce travail n'a pas mis en évidence de souche propre aux LAI, les différentes souches séquencées dans les LAI étant phylogénétiquement proches de celles d'autres lymphomes. L'étude des mutations sur les principaux gènes de latence ou de tégument, gènes les plus mutés, s'est révélée intéressante. Ainsi, il a été montré qu'*EBNA-1*, *EBNA-2* et *EBNA-LP* présentaient significativement plus de mutations chez les LAI que chez les autres lymphomes. Au niveau *EBNA-1*, la substitution T85A, située dans une région intervenant dans l'activation transcriptionnelle des autres gènes de latence, a été détectée dans de nombreux LAI, et pourrait donc jouer un rôle majeur dans la prolifération. De même, la mutation T585P qui survient dans le domaine de dimérisation de la protéine EBNA-1 et située dans les principaux épitopes reconnus par les CD4 et les CD8, était très représentée. Par ailleurs, les LAI présentaient particulièrement des mutations dans les gènes de tégument *BBRF2* et *BNRF1*, ainsi que dans *BKRF3*.

Les mutations au niveau d'un gène peuvent altérer l'expression du transcrit, qui peut à son tour, avoir pour conséquence une modification de la structure de la protéine ainsi que de son expression et/ou de sa fonction. En se basant sur cette théorie, les mutations présentées dans les séquences d'ADN génomique de l'EBV chez les patients souffrant de LAI nous conduisent à analyser le transcriptome de l'EBV chez ces patients afin de voir si ces mutations perturbent le fonctionnement de l'EBV et son implication dans cette pathologie. Ces résultats sont comparés

ensuite à ceux des autres lymphomes humains ainsi que des lignées cellulaires où le type de latence qu'elles présentent a déjà été défini.

Dans ce travail, nous avons initialement montré qu'il n'y avait pas de manière univoque d'exprimer les transcrits au cours d'un LAI et les 14 échantillons des patients atteints de LAI ne formaient pas de cluster. Le profil d'expression des gènes était en effet variable selon les lymphomes et même entre les néoplasies d'une même pathologie.

Par ailleurs, les résultats obtenus par l'analyse du RNA-seq ont aussi montré que les transcrits de latence les plus exprimés pour les LAI étaient les *BART*, et que ceux-ci étaient beaucoup moins exprimés pour les patients présentant un autre lymphome. Les *BART* constituent un ensemble complexe d'ARN polyadénylés et épissés qui partagent la même extrémité 3' et sont originaires de plusieurs ORF, à savoir *BARF0*, *RPMS1* et *A73*. Une importante expression des *BART* a également été révélée dans les cellules de NPC et de GC où leur expression pourrait conduire à une régulation de la prolifération, en participant probablement à ces pathologies (Strong *et al.*, 2013; Marquitz *et al.*, 2015; Verhoeven *et al.*, 2019). Les protéines putatives codées par les *BART* pourraient avoir des fonctions significatives sur la lymphomagenèse, mais ces protéines n'ont jamais été identifiées *in vivo* (Hitt *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2000; Al-Mozaini *et al.*, 2009). Ces ARN persistants sont localisés dans le noyau et il a été supposé qu'ils agissent comme des ARNinc qui contrôlent de façon sélective l'expression des gènes viraux et/ou cellulaires (Verhoeven *et al.*, 2019). Les transcrits *BART* codent également pour des miARN matures qui participent fortement au développement des tumeurs en assurant le maintien de la latence par une inhibition des transcrits lytiques, mais aussi en inhibant les défenses immunitaires (Cai *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2009). Le fait que des niveaux élevés de transcrits *BART* aient été détectés dans nos LAI permet de penser qu'ils jouent un rôle important dans cette pathologie, que ce soit en tant qu'ARNinc et/ou miARN.

De plus, l'expression du facteur de transcription viral *BZLF1* était présente, accompagnée d'une faible expression de *BRLF1* et d'un manque d'expression de la plupart des protéines du cycle lytique ce qui bloque le déclenchement du cycle lytique complet chez les LAI, se traduisant par une absence de réactivation virale qui pourrait produire de nouveaux virions. Le virus était donc en phase de latence. L'étude de la latence dans nos échantillons a montré que les biopsies de LAI portaient un EBV en latence II avec l'absence d'expression d'*EBNA-3*.

Paradoxalement, un gène lytique précoce, *BNLF2a*, a été trouvé fortement exprimé dans les biopsies de patients atteints de LAI ; c'est même le gène le plus exprimé. L'expression de *BNLF2a* pendant la phase de latence a déjà été rapportée, mais plutôt dans les carcinomes, notamment le GC, ainsi que dans les cancers bronchiques non à petites cellules (CBNPC) (Strong *et al.*, 2013; Kheir *et al.*, 2019), mais pas dans les lymphomes à notre connaissance. L'expression très élevée de *BNLF2a* permet probablement de protéger la cellule tumorale infectée contre les défenses du système immunitaire, résultant en une dérégulation des protéines HLA de classe I empêchant ainsi la présentation de l'antigène aux lymphocytes T CD8+ (Croft *et al.*, 2009; Horst *et al.*, 2009; Jochum *et al.*, 2012). Fait intéressant, la majorité des personnes atteintes de LAI exprimaient aussi le gène lytique tardif *BCRF1*. Ce gène code pour une protéine qui présente une grande homologie avec l'IL10 humaine et il est appelé *vIL10*. La protéine *vIL10* empêche les lymphocytes B infectés d'être éliminés par les cellules NK. Elle peut aussi bloquer

les réponses des cellules T auxiliaires et la production de cytokines inflammatoires, en stimulant la croissance et la différenciation des lymphocytes B par la suite (Rojas *et al.*, 2017; Jog *et al.*, 2018). La co-expression de ces deux protéines, BNLF2a et BCRF1, peut contribuer à l'échappement immunitaire et à la survie des cellules tumorales infectées.

Suite à l'expression de *EBNA-1*, *LMP-2* et *BNLF2a*, la latence observée dans nos échantillons a été étiquetée latence IIc comme celle déjà décrite par le chercheur Strong et ses collègues (Strong *et al.*, 2015). Elle était portée par 11/14 des LAI que nous avons testés.

Pour mieux comprendre le profil de l'EBV dans les tissus des lymphomes, nous avons comparé les résultats obtenus pour nos patients à ceux obtenus pour les lignées cellulaires. Nous avons donc étudié le transcriptome de l'EBV dans les lignées suivantes : B95.8, quatre lignées BL (Jijoye, Raji, P3HR1 et Namalwa), deux lignées NK/TL (SNK6 et Mec04) et quatre LCL (MLEB2, Kreb2, COAN et DPL). Nous avons ainsi montré que le profil viral n'était pas spécifique d'un type de pathologie.

Par ailleurs, l'expression des gènes de latence s'est révélée particulièrement intéressante, et *EBNA-LP* était fortement exprimé dans toutes les lignées sauf Mec04. Les BART étaient un peu plus exprimés dans les LCL que dans les autres lignées, bien que l'expression y soit faible. En outre, les LCL étaient comme prévu en latence III, bien que, selon les lignées, les gènes de latence étaient exprimés à des degrés divers. Les lignées BL, qui sont dérivées de tumeurs présentant une latence I, étaient principalement en latence I, tout en exprimant *EBNA-LP* (Jijoye, Namalwa, P3HR1), ou en latence III pour Raji, avec une faible expression d'*EBNA-3*. Ce changement de latence pour Raji a déjà été signalé et est dû aux conditions de culture (Bernasconi *et al.*, 2006; Hooykaas *et al.*, 2016).

Il est également intéressant de remarquer que nos lignées ont montré une expression de *BART* beaucoup plus faible que les tumeurs des patients, à l'exception de la lignée Mec04 qui a eu un comportement très particulier. Mec04 est la seule lignée, parmi celles étudiées ici, qui a fortement exprimé les BART ainsi que *LMP-2*, alors que *EBNA-1*, *LMP-1* et *EBNA-LP* étaient faiblement exprimés ainsi que les autres transcrits de latence.

Nous avons aussi montré que, parmi les gènes les plus exprimés dans toutes les lignées à l'exception de Mec04, se trouve *BHRF1* qui code pour un homologue de Bcl2 (Henderson *et al.*, 1993; Kelly *et al.*, 2005). *BHRF1* était par ailleurs très faiblement exprimé dans les échantillons de patients. Des miARN-BHRF1 sont codés par l'EBV. Ils sont systématiquement présents dans les premiers stades de l'infection. Ils limitent la production de la protéine BHRF1 et sont également présents dans les LCL (Bernhardt *et al.*, 2016). Ils participent à la transformation et à la prolifération des cellules B (Yin *et al.*, 2019). De manière intéressante, il a été démontré que EBV-miR-BHRF1-2 régule à la baisse *LMP-2A*. Dans cette étude, la lignée Mec04 était la seule à exprimer, très faiblement, *BHRF1* alors que *LMP-2A* était, en revanche, fortement exprimée.

Ces résultats permettent de supposer que le virus de l'EBV est impliqué dans le développement du LAI comme d'autres lymphomes.

Étant donné que les cellules tumorales infectées sécrètent des exosomes, il est donc important d'appréhender le contenu de ces exosomes en transcrits viraux, des messagers

emportés vers d'autres cellules, afin de mieux comprendre le mécanisme qu'utilise ce virus dans le développement de cette maladie. Ceci représente la deuxième partie de notre travail.

La présence d'exosomes dans le milieu extracellulaire a été reconnue dès la fin des années 1980 (Johnstone *et al.*, 1987). Cependant, les exosomes produits par les cellules ont d'abord été considérés comme des débris cellulaires résultant de lésions cellulaires, ou des sous-produits de l'homéostasie cellulaire, sans aucun effet significatif sur les cellules voisines. Ce n'est que récemment que ces vésicules extracellulaires se sont imposées comme des transporteurs fonctionnels d'une charge complexe de protéines, de lipides et d'acides nucléiques, capables de délivrer ces produits aux cellules réceptrices qu'ils rencontrent et qui peuvent finalement reprogrammer les cellules cibles distantes de leur relargage (Zhang *et al.*, 2019).

Par conséquent, les exosomes représentent une nouvelle voie de communication intercellulaire, qui peut jouer un rôle majeur dans de nombreux processus cellulaires, tels que la réponse immunitaire et la transduction des signaux (Gangoda *et al.*, 2015; Greening *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que les virus sont connus pour modifier la voie des exosomes de l'hôte à leur avantage. En général, les virus peuvent contrôler les exosomes pour aider à l'assemblage du virion, ainsi que pour libérer des composants cellulaires et viraux de l'hôte qui peuvent modifier la pathogenèse virale dans la cellule infectée ou dans les cellules voisines en évitant le système immunitaire (Sadeghipour and Mathias, 2017).

Dans cette étude, nous avons analysé les transcrits de l'EBV dans les exosomes produits par des lignées cellulaires humaines et nous avons comparé les résultats aux transcrits trouvés dans les cellules correspondantes.

Nous avons montré que les transcrits viraux étaient bien présents dans les exosomes, de manière variable selon les lignées. Par contre, on peut aussi remarquer que la composition en transcrits viraux des cellules et des exosomes n'est pas liée à l'origine de la cellule. Par exemple, les résultats obtenus sont très différents entre SNK6 et Mec04 qui sont des cellules NK ou entre les différentes cellules issues de BL. En ce qui concerne les exosomes, le transcriptome était assez similaire pour les lignées B95.8, Jijoye, P3HR1, SNK6, et Namalwa et les LCL (Kreb2, MLEB2, COAN), alors que DPL, Raji, et Mec04 avaient des profils différents.

Pour quelques lignées, il semble que les transcrits de l'EBV soient transférés dans les exosomes par un mécanisme actif avec phénomène sélectif. Par exemple, une sélection négative semble s'exercer sur les transcrits d'*EBNA-2* qui sont moins présents dans les exosomes que dans les cellules correspondantes. A l'inverse, les transcrits d'*EBNA-LP* sont beaucoup plus concentrés dans les exosomes que dans les cellules, révélant une sélection positive.

On peut noter aussi que beaucoup des transcrits les plus exprimés jouent un rôle dans l'immunoévasion, que ce soit au niveau de l'immunité innée ou adaptative. Il est compréhensible que les premières informations apportées à la cellule qui reçoit le contenu des exosomes soient une protection contre l'immunité de l'hôte.

Ainsi, nous avons montré que le transcrit de *BNLF2a* est trouvé à un taux élevé dans les exosomes de chaque lignée. Cette protéine est donc emportée de la cellule tumorale infectée vers les cellules saines voisines. La protéine correspondante, BNLF2a, semble jouer un rôle

fondamental, étant donné le niveau d'expression de transcrite et étant donné qu'il est présent dans les exosomes de chacune des lignées. La protéine BNLF2a, déjà mentionnée dans la première partie de notre projet, joue un rôle important dans le contournement de l'immunité (Horst *et al.*, 2009; Jochum *et al.*, 2012).

D'autres transcrits sont trouvés à niveau élevé dans les exosomes de la plupart des lignées (P3HR1, SNK6, COAN, MLEB2, Jijoye, Krb2, B95.8, et plus faiblement Namalwa). Certains codent aussi pour des protéines agissant au niveau de l'immunité innée. C'est par exemple le cas des transcrits de *BLRF2*, codant une protéine de tégument qui joue un rôle dans l'inhibition du système immunitaire inné de l'hôte en ciblant l'activité enzymatique cGAS qui est le principal capteur d'ADN cytosolique détectant l'invasion de l'ADN viral (Xu *et al.*, 2021). Quant au complexe BSLF2/BMLF1, il peut empêcher la cellule d'établir un état antiviral, en agissant comme un facteur d'épissage alternatif pour les ARN cellulaires tels que *STAT1*, résultant en un ARNm de *STAT1* incapable de produire l'isoforme STAT1 α (Verma and Swaminathan, 2008).

Parmi les transcrits très exprimés dans les exosomes se trouvent des transcrits de protéines vraisemblablement impliquées dans l'oncogenèse. De manière inattendue, les transcrits d'*EBNA-LP* sont fortement présents dans les exosomes de toutes les lignées sauf MECO4, bien que les transcrits d'*EBNA-2* soient globalement quasiment absents. Le principal rôle d'*EBNA-LP* est d'être un coactivateur de l'activité transcriptionnelle d'*EBNA-2*. On sait que dans certains lymphomes de Burkitt, *EBNA-2* n'est pas exprimé, tout comme les exons Y1Y2 d'*EBNA-LP* (programme de latence atypique Wp). Ceci est retrouvé dans la lignée P3HR1. Cette forme tronquée d'*EBNA-LP* rend les cellules plus résistantes à l'apoptose (Garibal *et al.*, 2007). Il est intéressant de remarquer dans notre travail que cette forme tronquée se retrouve beaucoup plus souvent dans les exosomes (7/11) que dans les cellules (4/11), les formes sélectionnées par les exosomes étant les formes tronquées, ceci quelle que soit l'origine de la lignée (BL, NK/TL, LCL). Ce sont donc ces formes tronquées qui seront transférées aux cellules receveuses, les rendant plus résistantes à l'apoptose. *EBNA-LP* peut aussi exercer son caractère oncogène par liaison à des protéines cellulaires comme des suppresseurs de tumeurs ou des protéines impliquées dans l'apoptose ou le cycle cellulaire (Ranger-Rogez, 2021). En outre, le transcrite *BHRF1* a été trouvé exprimé dans les exosomes de toutes les lignées cellulaires sauf la lignée Mec04 dans laquelle l'expression de *BHRF1* exosomal a été plus faible. Cette expression a été constitutivement trouvée à un taux élevé dans les LCL que nous avons établies (Bayda *et al.*, 2021). La protéine BHRF1 protège fortement les cellules contre l'apoptose en se comportant comme un vBcl2 se liant aux protéines cellulaires PUMA, BIM, BID, et BAK (Fitzsimmons *et al.*, 2020). Sa capacité à inhiber l'apoptose serait aussi liée à sa plasticité.

Ensuite, les exosomes des lignées Mec04, Raji, DPL et Namalwa se différencient des autres : ils expriment peu ou pas les transcrits précédents mais par contre les transcrits de *LMP-1*, *EBNA-1*, *LMP-2A* et *LMP-2B*, et *EBNA-2* dans le cas de Mec04, Raji et DPL, y sont présents en abondance contrairement aux autres lignées. Les trois premiers de ces transcrits au moins et *EBNA-2* peuvent participer à la lymphomogenèse (Lu *et al.*, 2010, 2016; Frappier, 2012b; El-Sharkawy, Al Zaidan and Malki, 2018; Saha and Robertson, 2019).

Enfin, on peut remarquer que Mec04, qui a un profil très différent des autres lignées, présente le transcrite *LMP-2A*, alors que *EBNA-LP*, et *BHRF1* n'étaient pas exprimés au niveau

cellulaire ni au niveau exosomal. Etant donné que l'EBV code pour les miARN-BHRF1 et que EBV-miR-BHRF1-2 régule à la baisse LMP-2A (Bernhardt *et al.*, 2016).

Chapitre V : Conclusions et Perspectives

Chapitre V : Conclusions et Perspectives

Dans la première partie de notre travail, nous avons montré que l'EBV est impliqué dans le développement du LAI comme d'autres lymphomes. Ce virus a présenté une expression significative des transcrits BART chez les LAI, supérieure à celle observée chez les autres lymphomes suggérant qu'ils pourraient jouer un rôle dans ce lymphome. Nous avons aussi identifié une forte expression de *BNLF2a* et *BCRF1* qui peuvent contribuer à l'échappement au système immunitaire et à la survie des cellules infectées par l'EBV. Par ailleurs, les LAI étaient en phase de latence IIc, latence dans laquelle les transcrits *EBNA-1*, *LMP-2*, et *BNLF2a* étaient exprimés.

La deuxième partie de notre travail a consisté à analyser l'expression des transcrits de l'EBV dans les exosomes sécrétés par des lignées cellulaires. Nous avons démontré, de nouveau, que ce virus peut jouer un rôle dans l'immunoévasion en sécrétant des exosomes chargés en protéines permettant le contournement de l'immunité. De la même manière, il peut participer à l'oncogenèse, en sélectionnant positivement, dans les exosomes des cellules infectées, des transcrits viraux impliqués dans l'oncogenèse. Il était aussi remarquable que les transcrits de l'EBV étaient présents dans les exosomes des cellules, d'une façon indépendante du type de cellule.

L'objectif ultime de ce travail était d'appliquer cette approche à des plasmas humains de patients atteints de LAI, afin de voir si les transcrits viraux présents dans les exosomes sont les mêmes pour tous les patients atteints de LAI et s'ils diffèrent d'autres pathologies. Le suivi longitudinal des patients permettra de voir si les transcrits exosomaux varient au cours du temps. Les patients seront aussi prélevés durant leur traitement avec pour objectif de surveiller l'expression des transcrits viraux dans les exosomes plasmatiques pendant le traitement. Il sera intéressant de voir s'il est possible de corréliser cette évolution à un pronostic.

Globalement, l'étude que nous faisons sera donc intéressante pour comprendre le mécanisme qu'utilise ce virus pour lutter contre le système immunitaire dans le développement et la dissémination de la maladie.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aggarwal, P. and Limaiem, F. (2022) *Reed Sternberg Cells*, *StatPearls*. Elsevier. doi: 10.1016/B978-0-12-374984-0.01286-9.
- Ahmed, W. *et al.* (2014) 'Epstein-Barr Virus-Encoded Small RNAs (EBERs) Are Present in Fractions Related to Exosomes Released by EBV-Transformed Cells', *PLoS ONE*. Edited by P. Busson, 9(6), p. e99163. doi: 10.1371/journal.pone.0099163.
- Ahmed, W., Tariq, S. and Khan, G. (2018) 'Tracking EBV-encoded RNAs (EBERs) from the nucleus to the excreted exosomes of B-lymphocytes', *Scientific Reports*, 8(1), p. 15438. doi: 10.1038/s41598-018-33758-4.
- Al-Mansour, Z., Nelson, B. P. and Evens, A. M. (2013) 'Post-Transplant Lymphoproliferative Disease (PTLD): Risk Factors, Diagnosis, and Current Treatment Strategies', *Current Hematologic Malignancy Reports*, 8(3), pp. 173–183. doi: 10.1007/s11899-013-0162-5.
- Al-Mozaini, M. *et al.* (2009) 'Epstein–Barr virus BART gene expression', *Journal of General Virology*, 90(2), pp. 307–316. doi: 10.1099/vir.0.006551-0.
- Albanese, M. *et al.* (2016) 'Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 113(42), pp. E6467–E6475. doi: 10.1073/pnas.1605884113.
- Ali, A. *et al.* (2022) 'Rta is the principal activator of Epstein-Barr virus epithelial lytic transcription', *PLOS Pathogens*. Edited by B. A. Glaunsinger, 18(9), p. e1010886. doi: 10.1371/journal.ppat.1010886.
- Allday, Martin J *et al.* (2015) *Epstein Barr Virus Volume 2, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Edited by C. Münz. Cham: Springer International Publishing (Current Topics in Microbiology and Immunology). doi: 10.1007/978-3-319-22834-1.
- Anagnostopoulos, I. *et al.* (1992) 'Heterogeneous Epstein-Barr virus infection patterns in peripheral T- cell lymphoma of angioimmunoblastic lymphadenopathy type', *Blood*, 80(7), pp. 1804–1812. doi: 10.1182/blood.V80.7.1804.1804.
- Antman, K. and Chang, Y. (2000) 'Kaposi's Sarcoma', *New England Journal of Medicine*, 342(14), pp. 1027–1038. doi: 10.1056/NEJM200004063421407.
- Aozasa, K., Takakuwa, T. and Nakatsuka, S. (2005) 'Pyothorax-Associated Lymphoma', *Advances in Anatomic Pathology*, 12(6), pp. 324–331. doi: 10.1097/01.pap.0000194627.50878.02.
- Aromseree, S. *et al.* (2017) 'High Levels of EBV-Encoded RNA 1 (EBER1) Trigger Interferon and Inflammation-Related Genes in Keratinocytes Expressing HPV16 E6/E7', *PLoS ONE*. Edited by S. Palit Deb. Public Library of Science, 12(1), p. e0169290. doi: 10.1371/journal.pone.0169290.
- Arvey, A. *et al.* (2015) 'The tumor virus landscape of AIDS-related lymphomas', *Blood*, 125(20), pp. e14–e22. doi: 10.1182/blood-2014-11-599951.
- Asano, N., Kato, S. and Nakamura, S. (2013) 'Epstein–Barr virus-associated natural killer/T-cell lymphomas', *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 26(1), pp. 15–21. doi: 10.1016/j.beha.2013.04.002.

- Aslan, C. *et al.* (2019) 'Tumor-derived exosomes: Implication in angiogenesis and antiangiogenesis cancer therapy', *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), pp. 16885–16903. doi: 10.1002/jcp.28374.
- Au, W. Y. (2010) 'Current management of nasal NK/T-cell lymphoma.', *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 24(4), pp. 352–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20464847>.
- Bachy, E. *et al.* (2022) 'Romidepsin Plus CHOP Versus CHOP in Patients With Previously Untreated Peripheral T-Cell Lymphoma: Results of the Ro-CHOP Phase III Study (Conducted by LYSA)', *Journal of Clinical Oncology*, 40(3), pp. 242–251. doi: 10.1200/JCO.21.01815.
- Baer, R. *et al.* (1984) 'DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome.', *Nature*, 310(5974), pp. 207–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6087149>.
- Bahri, R. *et al.* (2022) 'Epstein-Barr Virus (EBV) Is Mostly Latent and Clonal in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL)', *Cancers*, 14(12). doi: 10.3390/cancers14122899.
- Balaj, L. *et al.* (2011) 'Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences', *Nature Communications*, 2(1), p. 180. doi: 10.1038/ncomms1180.
- Banko, A. *et al.* (2012) 'Carboxy-terminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein-Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients', *Journal of Medical Virology*, 84(4), pp. 632–642. doi: 10.1002/jmv.23217.
- Barros, M. H. M. *et al.* (2019) 'Revisiting the Tissue Microenvironment of Infectious Mononucleosis: Identification of EBV Infection in T Cells and Deep Characterization of Immune Profiles', *Frontiers in Immunology*, 10(February), pp. 1–15. doi: 10.3389/fimmu.2019.00146.
- Bayda, N. *et al.* (2021) 'Comprehensive Epstein-Barr Virus Transcriptome by RNA-Sequencing in Angioimmunoblastic T Cell Lymphoma (AITL) and Other Lymphomas', *Cancers*, 13(4), p. 610. doi: 10.3390/cancers13040610.
- Bennani, N. N. *et al.* (2019) 'A Phase II Study of Nivolumab in Patients with Relapsed or Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma', *Blood*, 134(Supplement_1), pp. 467–467. doi: 10.1182/blood-2019-126194.
- Bernasconi, M. *et al.* (2006) 'Quantitative profiling of housekeeping and Epstein-Barr virus gene transcription in Burkitt lymphoma cell lines using an oligonucleotide microarray', *Virology Journal*, 3(1), pp. 43–58. doi: 10.1186/1743-422X-3-43.
- Bernhardt, K. *et al.* (2016) 'A Viral microRNA Cluster Regulates the Expression of PTEN, p27 and of a bcl-2 Homolog', *PLOS Pathogens*. Edited by E. K. Flemington, 12(1), p. e1005405. doi: 10.1371/journal.ppat.1005405.
- Bhattacharjee, S. *et al.* (2016) 'Role of EBNA-3 Family Proteins in EBV Associated B-cell Lymphomagenesis', *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00457.
- Blanchard, N. *et al.* (2002) 'TCR Activation of Human T Cells Induces the Production of Exosomes Bearing the TCR/CD3/ζ Complex', *The Journal of Immunology*, 168(7), pp. 3235–3241. doi: 10.4049/jimmunol.168.7.3235.
- Borna, S. *et al.* (2020) 'Mechanisms determining a differential threshold for sensing Src family kinase activity by B and T cell antigen receptors', *Journal of Biological Chemistry*, 295(37), pp. 12935–12945. doi: 10.1074/jbc.RA120.013552.
- Boyer, D. F. *et al.* (2017) 'Fibrin-associated EBV-positive Large B-Cell Lymphoma', *American*

Journal of Surgical Pathology, 41(3), pp. 299–312. doi: 10.1097/PAS.0000000000000775.

Brooks, L. *et al.* (1992) 'Epstein-Barr virus latent gene transcription in nasopharyngeal carcinoma cells: coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 transcripts.', *Journal of Virology*, 66(5), pp. 2689–2697. doi: 10.1128/jvi.66.5.2689-2697.1992.

Burkitt, D. (1958) 'A sarcoma involving the jaws in African children', *The British journal of surgery. Br J Surg*, 46(197), pp. 218–223. doi: 10.1002/BJS.18004619704.

Caby, M.-P. *et al.* (2005) 'Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma', *International Immunology*, 17(7), pp. 879–887. doi: 10.1093/intimm/dxh267.

Cai, L. *et al.* (2015) 'Epstein–Barr virus-encoded microRNA BART1 induces tumour metastasis by regulating PTEN-dependent pathways in nasopharyngeal carcinoma', *Nature Communications*, 6(1), p. 7353. doi: 10.1038/ncomms8353.

Cai, X. *et al.* (2006) 'Epstein–Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed', *PLoS Pathogens*. Edited by D. Ganem, 2(3), p. e23. doi: 10.1371/journal.ppat.0020023.

Camargo, M. C. *et al.* (2011) 'Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis', *British Journal of Cancer*, 105(1), pp. 38–43. doi: 10.1038/bjc.2011.215.

Campo, E. *et al.* (2011) 'The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications', *Blood*, 117(19), pp. 5019–5032. doi: 10.1182/blood-2011-01-293050.

Castillo, J. J. *et al.* (2016) 'EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management', *American Journal of Hematology*, 91(5), pp. 529–537. doi: 10.1002/ajh.24370.

Cedena, M. T. *et al.* (2017) 'Mutations in the DNA methylation pathway and number of driver mutations predict response to azacitidine in myelodysplastic syndromes', *Oncotarget*, 8(63), pp. 106948–106961. doi: 10.18632/oncotarget.22157.

Cen, O. and Longnecker, R. (2015) 'Latent Membrane Protein 2 (LMP2).', *Current topics in microbiology and immunology*, 391, pp. 151–80. doi: 10.1007/978-3-319-22834-1_5.

Chairoungdua, A. *et al.* (2010) 'Exosome release of β -catenin: a novel mechanism that antagonizes Wnt signaling', *Journal of Cell Biology*, 190(6), pp. 1079–1091. doi: 10.1083/jcb.201002049.

Chakravorty, S. *et al.* (2019) 'Integrated Pan-Cancer Map of EBV-Associated Neoplasms Reveals Functional Host–Virus Interactions', *Cancer Research*, 79(23). doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-0615.

Chang, C.-W. *et al.* (2015) 'BGLF4 Kinase Modulates the Structure and Transport Preference of the Nuclear Pore Complex To Facilitate Nuclear Import of Epstein-Barr Virus Lytic Proteins'. doi: 10.1128/JVI.02880-14.

Chen, J. and Longnecker, R. (2019) 'Epithelial cell infection by Epstein–Barr virus', *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press, 43(6), p. 674. doi: 10.1093/FEMSRE/FUZ023.

Chiba, S. and Sakata-Yanagimoto, M. (2020) 'Advances in understanding of angioimmunoblastic T-cell lymphoma', *Leukemia*, 34, pp. 2592–2606. doi: 10.1038/s41375-020-0990-y.

CIRI (2013) *EBV life cycle*. Available at: ciri.inserm.fr/en/team/all-teams/oncogenic-herpesviruses/projects-and-grants/ (Accessed: 26 August 2018).

Cohen, M. *et al.* (2014) 'Epstein-Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma association is not only restricted to elderly patients', *International Journal of Cancer*, 135(12), pp. 2816–2824. doi: 10.1002/ijc.28942.

Comelli, L. *et al.* (2014) 'Characterization of secreted vesicles from vascular smooth muscle cells', *Molecular BioSystems*, 10(5), p. 1146. doi: 10.1039/c3mb70544g.

Concha, M. *et al.* (2012) 'Identification of New Viral Genes and Transcript Isoforms during Epstein-Barr Virus Reactivation using RNA-Seq', *Journal of Virology*, 86(3), pp. 1458–1467. doi: 10.1128/JVI.06537-11.

Correia, S. *et al.* (2017) 'Natural Variation of Epstein-Barr Virus Genes, Proteins, and Primary MicroRNA', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 91(15). doi: 10.1128/JVI.00375-17.

Correia, S. *et al.* (2018) 'Sequence Variation of Epstein-Barr Virus: Viral Types, Geography, Codon Usage, and Diseases', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 92(22). doi: 10.1128/JVI.01132-18.

Cortes, J. R. *et al.* (2018) 'RHOA G17V Induces T Follicular Helper Cell Specification and Promotes Lymphomagenesis', *Cancer Cell*, 33(2), pp. 259-273.e7. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.001.

Cosmopoulos, K. *et al.* (2009) 'Comprehensive Profiling of Epstein-Barr Virus MicroRNAs in Nasopharyngeal Carcinoma', *Journal of Virology*, 83(5), pp. 2357–2367. doi: 10.1128/JVI.02104-08.

Crenshaw, B. J. *et al.* (2018) 'Exosome Biogenesis and Biological Function in Response to Viral Infections', *The Open Virology Journal*, 12(1), pp. 134–148. doi: 10.2174/1874357901812010134.

Croft, N. P. *et al.* (2009) 'Stage-Specific Inhibition of MHC Class I Presentation by the Epstein-Barr Virus BNLF2a Protein during Virus Lytic Cycle', *PLoS Pathogens*. Edited by B. Sugden, 5(6), p. e1000490. doi: 10.1371/journal.ppat.1000490.

Crombie, J. L. and LaCasce, A. S. (2019) 'Epstein Barr virus associated B-cell lymphomas and iatrogenic lymphoproliferative disorders', *Frontiers in Oncology*, 9(MAR), pp. 1–9. doi: 10.3389/fonc.2019.00109.

D'Amore, F. *et al.* (2012) 'Up-Front Autologous Stem-Cell Transplantation in Peripheral T-Cell Lymphoma: NLG-T-01', *Journal of Clinical Oncology*, 30(25), pp. 3093–3099. doi: 10.1200/JCO.2011.40.2719.

Dambaugh, T. *et al.* (1980) 'Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(5 I), pp. 2999–3003. doi: 10.1073/pnas.77.5.2999.

Dang, X. T. T. *et al.* (2020) 'Extracellular Vesicles as an Efficient and Versatile System for Drug Delivery', *Cells*, 9(10), p. 2191. doi: 10.3390/cells9102191.

Dheekollu, J. *et al.* (2017) 'Carcinoma-risk variant of EBNA1 deregulates Epstein-Barr Virus episomal latency', *Oncotarget*, 8(5), pp. 7248–7264. doi: 10.18632/oncotarget.14540.

Dobay, M. P. *et al.* (2017) 'Integrative clinicopathological and molecular analyses of angioimmunoblastic T-cell lymphoma and other nodal lymphomas of follicular helper T-cell origin',

Haematologica, 102(4), pp. e148–e151. doi: 10.3324/haematol.2016.158428.

Dojcinov, S. D., Fend, F. and Quintanilla-Martinez, L. (2018) 'EBV-positive lymphoproliferations of B-T-and NK-cell derivation in non-immunocompromised hosts', *Pathogens*, 7(1). doi: 10.3390/pathogens7010028.

Drouet, E. (2020) 'The Role of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle in Tumor Progression: Consequences in Diagnosis and Therapy', in *Human Herpesvirus Infection - Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment*. IntechOpen. doi: 10.5772/intechopen.88607.

Dukers, D. F. *et al.* (2000) 'Direct Immunosuppressive Effects of EBV-Encoded Latent Membrane Protein 1', *The Journal of Immunology*, 165(2), pp. 663–670. doi: 10.4049/jimmunol.165.2.663.

Dunleavy, K., Wilson, W. H. and Jaffe, E. S. (2007) 'Angioimmunoblastic T cell lymphoma: pathobiological insights and clinical implications', *Current Opinion in Hematology*, 14(4), pp. 348–353. doi: 10.1097/MOH.0b013e328186ffbf.

Dunmire, S. K., Verghese, P. S. and Jr, H. H. B. (2018) 'Primary Epstein-Barr virus infection', *Journal of Clinical Virology*. Elsevier B.V. doi: 10.1016/j.jcv.2018.03.001.

Dupuis, J. *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', *The Lancet Haematology*, 2(4), pp. e160–e165. doi: 10.1016/S2352-3026(15)00023-X.

El-Sharkawy, A., Al Zaidan, L. and Malki, A. (2018) 'Epstein–Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis', *Frontiers in Oncology*, 8. doi: 10.3389/fonc.2018.00265.

Epstein, A. (2012) 'Burkitt lymphoma and the discovery of Epstein–Barr virus', *British Journal of Haematology*. John Wiley & Sons, Ltd, 156(6), pp. 777–779. doi: 10.1111/J.1365-2141.2011.09008.X.

Escola, J.-M. *et al.* (1998) 'Selective Enrichment of Tetraspan Proteins on the Internal Vesicles of Multivesicular Endosomes and on Exosomes Secreted by Human B-lymphocytes', *Journal of Biological Chemistry*, 273(32), pp. 20121–20127. doi: 10.1074/jbc.273.32.20121.

Fan, Q. *et al.* (2018) 'The emerging role of exosome-derived non-coding RNAs in cancer biology', *Cancer Letters*. Elsevier B.V., 414, pp. 107–115. doi: 10.1016/j.canlet.2017.10.040.

Farrell, P. J. (2019) 'Epstein–Barr Virus and Cancer', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. Wiley, 14(1), pp. 29–53. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012418-013023.

Fauré, J. *et al.* (2006) 'Exosomes are released by cultured cortical neurones', *Molecular and Cellular Neuroscience*, 31(4), pp. 642–648. doi: 10.1016/j.mcn.2005.12.003.

Federico, M. *et al.* (2013) 'Clinicopathologic Characteristics of Angioimmunoblastic T-Cell Lymphoma: Analysis of the International Peripheral T-Cell Lymphoma Project', *Journal of Clinical Oncology*, 31(2). doi: 10.1200/JCO.2011.37.3647.

Feederle, R. *et al.* (2011) 'A Viral microRNA Cluster Strongly Potentiates the Transforming Properties of a Human Herpesvirus', *PLoS Pathogens*. Edited by B. Damania. Public Library of Science, 7(2), p. e1001294. doi: 10.1371/journal.ppat.1001294.

Fitzsimmons, L. *et al.* (2020) 'EBV BCL-2 homologue BHRF1 drives chemoresistance and

lymphomagenesis by inhibiting multiple cellular pro-apoptotic proteins', *Cell Death & Differentiation*, 27(5), pp. 1554–1568. doi: 10.1038/s41418-019-0435-1.

Forte, E. and Luftig, M. A. (2011) 'The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation', *Microbes and Infection*, 13(14–15), pp. 1156–1167. doi: 10.1016/j.micinf.2011.07.007.

Fotheringham, J. A., Coalson, N. E. and Raab-Traub, N. (2012) 'Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein-2A Induces ITAM/Syk- and Akt-Dependent Epithelial Migration through α V-Integrin Membrane Translocation', *Journal of Virology*, 86(19), pp. 10308–10320. doi: 10.1128/JVI.00853-12.

Fox, C. P. *et al.* (2010) 'A novel latent membrane 2 transcript expressed in Epstein-Barr virus-positive NK- and T-cell lymphoproliferative disease encodes a target for cellular immunotherapy', *Blood*, 116(19), pp. 3695–3704. doi: 10.1182/blood-2010-06-292268.

Frappier, L. (2012a) 'Contributions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) to Cell Immortalization and Survival', *Viruses*, 4(9), pp. 1537–1547. doi: 10.3390/v4091537.

Frappier, L. (2012b) 'Role of EBNA1 in NPC tumourigenesis', *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), pp. 154–161. doi: 10.1016/j.semcancer.2011.12.002.

Friberg, A. *et al.* (2015) 'The EBNA-2 N-Terminal Transactivation Domain Folds into a Dimeric Structure Required for Target Gene Activation', *PLOS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 11(5), p. e1004910. doi: 10.1371/journal.ppat.1004910.

Frost, T. C. and Gewurz, B. E. (2018) 'Epigenetic crossroads of the Epstein-Barr virus B-cell relationship', *Current Opinion in Virology*, 32, pp. 15–23. doi: 10.1016/j.coviro.2018.08.012.

Fu, Q., He, C. and Mao, Z. (2013) 'Epstein-Barr virus interactions with the Bcl-2 protein family and apoptosis in human tumor cells', *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 14(1), pp. 8–24. doi: 10.1631/jzus.B1200189.

Fugl, A. and Andersen, C. L. (2019) 'Epstein-Barr virus and its association with disease - a review of relevance to general practice', *BMC Family Practice*, 20(1), p. 62. doi: 10.1186/s12875-019-0954-3.

Fujisawa, M. *et al.* (2018) 'Activation of RHOA-VAV1 signaling in angioimmunoblastic T-cell lymphoma', *Leukemia*, 32(3), pp. 694–702. doi: 10.1038/leu.2017.273.

Fukayama, M. and Ushiku, T. (2011) 'Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma', *Pathology - Research and Practice*, 207(9), pp. 529–537. doi: 10.1016/j.prp.2011.07.004.

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.', *Journal of virology*, 81(17), pp. 9299–306. doi: 10.1128/JVI.00537-07.

Gallo, A. *et al.* (2017) 'Global profiling of viral and cellular non-coding RNAs in Epstein-Barr virus-induced lymphoblastoid cell lines and released exosome cargos', *Cancer Letters*. Elsevier Ltd, 388, pp. 334–343. doi: 10.1016/j.canlet.2016.12.003.

Gangoda, L. *et al.* (2015) 'Extracellular vesicles including exosomes are mediators of signal transduction: Are they protective or pathogenic?', *PROTEOMICS*, 15(2–3), pp. 260–271. doi: 10.1002/pmic.201400234.

Garibal, J. *et al.* (2007) 'Truncated Form of the Epstein-Barr Virus Protein EBNA-LP Protects

against Caspase-Dependent Apoptosis by Inhibiting Protein Phosphatase 2A', *Journal of Virology*, 81(14), pp. 7598–7607. doi: 10.1128/JVI.02435-06.

Gill, S., Catchpole, R. and Forterre, P. (2019) 'Extracellular membrane vesicles in the three domains of life and beyond', *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), pp. 273–303. doi: 10.1093/femsre/fuy042.

Gilligan, K. J. *et al.* (1991) 'Expression of the Epstein-Barr virus BamHI A fragment in nasopharyngeal carcinoma: evidence for a viral protein expressed in vivo.', *Journal of virology*, 65(11), pp. 6252–9. doi: 10.1128/JVI.65.11.6252-6259.1991.

Glaser, L. V. *et al.* (2017) 'EBF1 binds to EBNA2 and promotes the assembly of EBNA2 chromatin complexes in B cells', *PLOS Pathogens*. Edited by P. D. Ling, 13(10), p. e1006664. doi: 10.1371/journal.ppat.1006664.

Glaser, S. L. *et al.* (1997) 'Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: Epidemiologic characteristics in international data', *International Journal of Cancer*, 70(4), pp. 375–382. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(19970207)70:4<375::AID-IJC1>3.0.CO;2-T.

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.', *Journal of virology*, 62(3), pp. 902–11. doi: 10.1128/JVI.62.3.902-911.1988.

Gnanasundram, S. V. *et al.* (2017) 'PI3K δ activates E2F1 synthesis in response to mRNA translation stress', *Nature Communications*, 8(1), p. 2103. doi: 10.1038/s41467-017-02282-w.

Gottschalk, S. *et al.* (2001) 'An Epstein-Barr virus deletion mutant associated with fatal lymphoproliferative disease unresponsive to therapy with virus-specific CTLs', *Blood*, 97(4), pp. 835–843. doi: 10.1182/blood.V97.4.835.

Graham S. Hudson *et al.* (1985) 'The Short Unique Region of the 895-8 Epstein-Barr', *Virology*, 147(1), pp. 81–98. doi: 10.1016/0042-6822(85)90229-6.

Grande, B. M. *et al.* (2019) 'Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma', *Blood*, 133(12), pp. 1313–1324. doi: 10.1182/blood-2018-09-871418.

Greening, D. W. *et al.* (2015) 'Exosomes and their roles in immune regulation and cancer', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, pp. 72–81. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.009.

Gregorovic, G. *et al.* (2015) 'Epstein-Barr Viruses (EBVs) Deficient in EBV-Encoded RNAs Have Higher Levels of Latent Membrane Protein 2 RNA Expression in Lymphoblastoid Cell Lines and Efficiently Establish Persistent Infections in Humanized Mice', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 89(22), pp. 11711–11714. doi: 10.1128/JVI.01873-15.

Gru, A. A. *et al.* (2015) 'The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment', *Curr Hematol Malign Rep*, 10(4), pp. 456–467. doi: 10.1007/s11899-015-0292-z.The.

Grulich, A. E. and Vajdic, C. M. (2015) 'The Epidemiology of Cancers in Human Immunodeficiency Virus Infection and After Organ Transplantation', *Seminars in Oncology*, 42(2), pp. 247–257. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.029.

Grywalska, E. and Rolinski, J. (2015) 'Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomas', *Seminars in Oncology*. Elsevier, 42(2), pp. 291–303. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.12.030.

Gunvén, P. *et al.* (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* 1970 228:5276. Nature Publishing Group, 228(5276), pp. 1053–1056. doi: 10.1038/2281053a0.

Gurung, S. *et al.* (2021) 'The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling', *Cell Communication and Signaling*. BioMed Central, 19(1), p. 47. doi: 10.1186/s12964-021-00730-1.

Hammerschmidt, W. and Sugden, B. (1988) 'Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus', *Cell*, 55(3), pp. 427–433. doi: 10.1016/0092-8674(88)90028-1.

Harding, C., Heuser, J. and Stahl, P. (1984) 'Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding.', *European journal of cell biology*, 35(2), pp. 256–63. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6151502>.

Harris, N. L. *et al.* (1994) 'A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group.', *Blood*, 84(5), pp. 1361–92. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8068936>.

Harter, M. R. *et al.* (2016) 'BS69/ZMYND11 C-Terminal Domains Bind and Inhibit EBNA2', *PLoS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 12(2), p. e1005414. doi: 10.1371/journal.ppat.1005414.

Harth-Hertle, M. L. *et al.* (2013) 'Inactivation of Intergenic Enhancers by EBNA3A Initiates and Maintains Polycomb Signatures across a Chromatin Domain Encoding CXCL10 and CXCL9', *PLoS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 9(9), p. e1003638. doi: 10.1371/journal.ppat.1003638.

HAUSEN, H. ZUR *et al.* (1970) 'Epstein–Barr Virus in Burkitt's Lymphoma and Nasopharyngeal Carcinoma: EBV DNA in Biopsies of Burkitt Tumours and Anaplastic Carcinomas of the Nasopharynx', *Nature*, 228(5276), pp. 1056–1058. doi: 10.1038/2281056a0.

He, J. *et al.* (2017) 'Positive regulation of TAZ expression by EBV-LMP1 contributes to cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma', *Oncotarget*, 8(32), pp. 52333–52344. doi: 10.18632/oncotarget.13775.

Henderson, S. *et al.* (1993) 'Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), pp. 8479–8483. doi: 10.1073/pnas.90.18.8479.

Henne, W. M., Stenmark, H. and Emr, S. D. (2013) 'Molecular Mechanisms of the Membrane Sculpting ESCRT Pathway', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(9), pp. a016766–a016766. doi: 10.1101/cshperspect.a016766.

Hertle, M. L. *et al.* (2009) 'Differential Gene Expression Patterns of EBV Infected EBNA-3A Positive and Negative Human B Lymphocytes', *PLoS Pathogens*. Edited by S. H. Speck, 5(7), p. e1000506. doi: 10.1371/journal.ppat.1000506.

Higuchi, H. *et al.* (2018) 'Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma', *Blood*, 131(23), pp. 2552–2567. doi: 10.1182/blood-2017-07-794529.

Hitt, M. M. *et al.* (1989) 'EBV gene expression in an NPC-related tumour.', *The EMBO Journal*, 8(9), pp. 2639–2651. doi: 10.1002/j.1460-2075.1989.tb08404.x.

- Hooykaas, M. J. G. *et al.* (2016) 'Comprehensive profiling of functional Epstein-Barr virus miRNA expression in human cell lines', *BMC Genomics*, 17(1), pp. 1–13. doi: 10.1186/s12864-016-2978-6.
- Horst, D. *et al.* (2009) 'Specific Targeting of the EBV Lytic Phase Protein BNLF2a to the Transporter Associated with Antigen Processing Results in Impairment of HLA Class I-Restricted Antigen Presentation', *The Journal of Immunology*, 182(4), pp. 2313–2324. doi: 10.4049/jimmunol.0803218.
- Huang, J. *et al.* (2012) 'Sequential development of diffuse large B-cell lymphoma in a patient with angioimmunoblastic T-cell lymphoma', *Diagnostic Cytopathology*, 40(4), pp. 346–351. doi: 10.1002/dc.21641.
- Hurwitz, S. N. *et al.* (2016) 'Nanoparticle analysis sheds budding insights into genetic drivers of extracellular vesicle biogenesis', *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), p. 31295. doi: 10.3402/jev.v5.31295.
- Hurwitz, S. N. *et al.* (2017) 'CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF- κ B Signaling', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 91(5). doi: 10.1128/JVI.02251-16.
- 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', *Journal of General Virology*, 94(5), pp. 1127–1133. doi: 10.1099/vir.0.049221-0.
- Iqbal, J. *et al.* (2010) 'Molecular signatures to improve diagnosis in peripheral T-cell lymphoma and prognostication in angioimmunoblastic T-cell lymphoma', *Blood*, 115(5), pp. 1026–1036. doi: 10.1182/blood-2009-06-227579.
- Ishida, F. (2018) 'Aggressive NK-Cell Leukemia', *Frontiers in Pediatrics*, 6. doi: 10.3389/fped.2018.00292.
- Iwakiri, D. (2014) 'Epstein-Barr virus-encoded RNAs: Key molecules in viral pathogenesis', *Cancers*, 6(3), pp. 1615–1630. doi: 10.3390/cancers6031615.
- Iwakiri, D. (2016) 'Multifunctional non-coding Epstein–Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis', *Virus Research*. Elsevier B.V., 212, pp. 30–38. doi: 10.1016/j.virusres.2015.08.007.
- Jadli, A. S. *et al.* (2020) 'Inside(sight) of tiny communicator: exosome biogenesis, secretion, and uptake', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467(1–2), pp. 77–94. doi: 10.1007/s11010-020-03703-z.
- Jaffe, E. S. (2006) 'Pathobiology of peripheral T-cell lymphomas.', *Hematology. American Society of Hematology. Education Program*, pp. 317–22. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.317.
- Jiang, L. *et al.* (2018) 'EBNA1-targeted inhibitors: Novel approaches for the treatment of Epstein-Barr virus-associated cancers', *Theranostics*, 8(19), pp. 5307–5319. doi: 10.7150/thno.26823.
- Jochum, S. *et al.* (2012) 'The EBV Immuno-evasins vIL-10 and BNLF2a Protect Newly Infected B Cells from Immune Recognition and Elimination', *PLoS Pathogens*. Edited by P. G. Stevenson, 8(5), p. e1002704. doi: 10.1371/journal.ppat.1002704.
- Jog, N. R. *et al.* (2018) 'Epstein Barr virus interleukin 10 suppresses anti-inflammatory phenotype in human monocytes', *Frontiers in Immunology*, 9(OCT), pp. 1–11. doi: 10.3389/fimmu.2018.02198.

Johnstone, R. M. *et al.* (1987) 'Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes).', *The Journal of biological chemistry*, 262(19), pp. 9412–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3597417>.

Johnstone, R. M., Bianchini, A. and Teng, K. (1989) 'Reticulocyte maturation and exosome release: transferrin receptor containing exosomes shows multiple plasma membrane functions.', *Blood*, 74(5), pp. 1844–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2790208>.

Kahlert, C. *et al.* (2014) 'Identification of Double-stranded Genomic DNA Spanning All Chromosomes with Mutated KRAS and p53 DNA in the Serum Exosomes of Patients with Pancreatic Cancer', *Journal of Biological Chemistry*, 289(7), pp. 3869–3875. doi: 10.1074/jbc.C113.532267.

Kalra, H., Drummen, G. and Mathivanan, S. (2016) 'Focus on Extracellular Vesicles: Introducing the Next Small Big Thing', *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2). doi: 10.3390/ijms17020170.

Kaneda, A. *et al.* (2012) 'Epstein–Barr Virus Infection as an Epigenetic Driver of Tumorigenesis', *Cancer Research*, 72(14), pp. 3445–3450. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3919.

Kang, M.-S. and Kieff, E. (2015) 'Epstein–Barr virus latent genes', *Experimental & Molecular Medicine*, 47(1), pp. e131–e131. doi: 10.1038/emm.2014.84.

Karube, K. *et al.* (2021) 'The expression of CD30 and its clinico-pathologic significance in peripheral T-cell lymphomas', *Expert Review of Hematology*, 14(8), pp. 777–787. doi: 10.1080/17474086.2021.1955344.

Kato, K. *et al.* (2003) 'Identification of protein kinases responsible for phosphorylation of Epstein–Barr virus nuclear antigen leader protein at serine-35, which regulates its coactivator function', *Journal of General Virology*, 84(12), pp. 3381–3392. doi: 10.1099/vir.0.19454-0.

Kelly, G. L. *et al.* (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, pp. 10709–10717.

Kenney, S. C. and Mertz, J. E. (2014) 'Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus', *Seminars in Cancer Biology*, 26, pp. 60–68. doi: 10.1016/j.semcan.2014.01.002.

Kheir, F. *et al.* (2019) 'Detection of Epstein-Barr virus infection in non-small cell lung cancer', *Cancers*, 11(6). doi: 10.3390/cancers11060759.

Kieser, A. and Sterz, K. R. (2015) 'The Latent Membrane Protein 1 (LMP1)', *Current topics in microbiology and immunology*, 391, pp. 119–49. doi: 10.1007/978-3-319-22834-1_4.

Kim, D. N. and Lee, S. K. (2012) 'Biogenesis of Epstein–Barr virus microRNAs', *Molecular and Cellular Biochemistry*, 365(1–2), pp. 203–210. doi: 10.1007/s11010-012-1261-7.

Kim, J. H. *et al.* (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(3), pp. 5361–5370. doi: 10.18632/oncotarget.14243.

Kim, S.-M. *et al.* (2017) 'EBV-encoded EBNA1 regulates cell viability by modulating miR34a-NOX2-ROS signaling in gastric cancer cells', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 494(3–4), pp. 550–555. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.095.

Kimura, H. and Fujiwara, S. (2019) 'Overview of EBV-Associated T/NK-Cell Lymphoproliferative

Diseases', *Frontiers in Pediatrics*, 6. doi: 10.3389/fped.2018.00417.

Kimura, H., Kawada, J. and Ito, Y. (2013) 'Epstein-Barr virus-associated lymphoid malignancies: the expanding spectrum of hematopoietic neoplasms.', *Nagoya journal of medical science*, 75(3–4), pp. 169–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24640173>.

Kitagawa, N. (2000) 'Epstein-Barr virus-encoded poly(A)- RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction', *The EMBO Journal*, 19(24), pp. 6742–6750. doi: 10.1093/emboj/19.24.6742.

Ko, Y.-H. (2015) 'EBV and human cancer', *Experimental and Molecular Medicine*. Nature Publishing Group, 47(1), p. e130. doi: 10.1038/emm.2014.109.

Koff, J. L. *et al.* (2018) 'Impact of the posttransplant lymphoproliferative disorder subtype on survival', *Cancer*, 124(11), pp. 2327–2336. doi: 10.1002/cncr.31339.

Komano, J. *et al.* (1999) 'Oncogenic Role of Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs in Burkitt's Lymphoma Cell Line Akata', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 73(12), pp. 9827–9831. doi: 10.1128/JVI.73.12.9827-9831.1999.

Konishi, N. *et al.* (2018) ' BGLF2 Increases Infectivity of Epstein-Barr Virus by Activating AP-1 upon De Novo Infection ', *mSphere*. American Society for Microbiology, 3(2). doi: 10.1128/MSPHERE.00138-18.

Krämer-Albers, E.-M. *et al.* (2007) 'Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins: Trophic support for axons?', *PROTEOMICS – CLINICAL APPLICATIONS*, 1(11), pp. 1446–1461. doi: 10.1002/prca.200700522.

Kuipers, M. E. *et al.* (2018) 'Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview', *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). doi: 10.3389/fmicb.2018.02182.

Kutok, J. L. and Wang, F. (2006) 'SPECTRUM OF EPSTEIN-BARR VIRUS–ASSOCIATED DISEASES', *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 1(1), pp. 375–404. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209.

Kuzembayeva, M., Hayes, M. and Sugden, B. (2014) 'Multiple functions are mediated by the miRNAs of Epstein-Barr virus', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 7(1), pp. 61–65. doi: 10.1016/j.coviro.2014.04.003.

Lammoglia Cobo, M. F. *et al.* (2022) 'Reconstitution of EBV-directed T cell immunity by adoptive transfer of peptide-stimulated T cells in a patient after allogeneic stem cell transplantation for AITL', *PLOS Pathogens*. Edited by M. A. Luftig, 18(4), p. e1010206. doi: 10.1371/journal.ppat.1010206.

Lässer, C. *et al.* (2011) 'Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: uptake by macrophages', *Journal of Translational Medicine*, 9(1), p. 9. doi: 10.1186/1479-5876-9-9.

Lee, J.-H. *et al.* (2009) 'Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: A meta-analysis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(3), pp. 354–365. doi: 10.1111/j.1440-1746.2009.05775.x.

Lemonnier, F. *et al.* (2018) 'Treatment with 5-azacytidine induces a sustained response in patients with angioimmunoblastic T-cell lymphoma', *Blood*, 132(21), pp. 2305–2309. doi: 10.1182/blood-2018-04-840538.

- de Leval, L. *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(11), pp. 4952–4963. doi: 10.1182/blood-2006-10-055145.
- de Leval, L. *et al.* (2015) 'Angioimmunoblastic T-cell lymphoma is the most common T-cell lymphoma in two distinct French information data sets', *Haematologica*. Ferrata Storti Foundation, 100(9), p. e361. doi: 10.3324/HAEMATOL.2015.126300.
- de Leval, L. (2020) 'Approach to nodal-based T-cell lymphomas', *Pathology*, 52(1), pp. 78–99. doi: 10.1016/j.pathol.2019.09.012.
- de Leval, L. and Gaulard, P. (2008) 'Pathobiology and Molecular Profiling of Peripheral T-Cell Lymphomas', *Hematology*, 2008(1), pp. 272–279. doi: 10.1182/asheducation-2008.1.272.
- Li, C. *et al.* (2014) 'Abnormal immunophenotype provides a key diagnostic marker: a report of 29 cases of de novo aggressive natural killer cell leukemia', *Translational Research*, 163(6), pp. 565–577. doi: 10.1016/j.trsl.2014.01.010.
- Li, C. W., Jheng, B. R. and Chen, B. Sen (2018) *Investigating genetic-and-epigenetic networks, and the cellular mechanisms occurring in Epstein–Barr virus-infected human B lymphocytes via big data mining and genome-wide two-sided NGS data identification*, *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0202537.
- Li, H. *et al.* (2016) 'Epstein-Barr virus lytic reactivation regulation and its pathogenic role in carcinogenesis', *International Journal of Biological Sciences*, 12(11), pp. 1309–1318. doi: 10.7150/ijbs.16564.
- Li, L. *et al.* (2018) 'Epstein-Barr Virus-Induced Epigenetic Pathogenesis of Viral-Associated Lymphoepithelioma-Like Carcinomas and Natural Killer/T-Cell Lymphomas', *Pathogens*, 7(3), p. 63. doi: 10.3390/pathogens7030063.
- Li, N. *et al.* (2010) 'Discovery of Selective Inhibitors Against EBNA1 via High Throughput In Silico Virtual Screening', *PLoS ONE*. Edited by T. F. Schulz, 5(4), p. e10126. doi: 10.1371/journal.pone.0010126.
- Li, P. *et al.* (2017) 'Progress in Exosome Isolation Techniques', *Theranostics*, 7(3), pp. 789–804. doi: 10.7150/thno.18133.
- Lin, T.-C. *et al.* (2013) 'Epstein-Barr Virus–Encoded miR-BART20-5p Inhibits T-bet Translation with Secondary Suppression of p53 in Invasive Nasal NK/T-Cell Lymphoma', *The American Journal of Pathology*, 182(5), pp. 1865–1875. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.025.
- Lin, Y. *et al.* (2017) 'Prognostic role of TET2 deficiency in myelodysplastic syndromes: A meta-analysis', *Oncotarget*, 8(26), pp. 43295–43305. doi: 10.18632/oncotarget.17177.
- Lin, Z. *et al.* (2016) 'Secreted Oral Epithelial Cell Membrane Vesicles Induce Epstein-Barr Virus Reactivation in Latently Infected B Cells', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 90(7), pp. 3469–3479. doi: 10.1128/JVI.02830-15.
- Lo, A. K. F. *et al.* (2007) 'Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(41), pp. 16164–16169. doi: 10.1073/pnas.0702896104.
- Loong, F. *et al.* (2010) 'Diffuse large B-cell lymphoma associated with chronic inflammation as an incidental finding and new clinical scenarios', *Modern Pathology*, 23(4), pp. 493–501. doi: 10.1038/modpathol.2009.168.

- Lu, F. *et al.* (2010) 'Genome-wide analysis of host-chromosome binding sites for Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 1 (EBNA1)', *Virology Journal*, 7, pp. 1–17. doi: 10.1186/1743-422X-7-262.
- Lu, F. *et al.* (2016) 'EBNA2 Drives Formation of New Chromosome Binding Sites and Target Genes for B-Cell Master Regulatory Transcription Factors RBP-jk and EBF1', *PLOS Pathogens*. Edited by E. K. Flemington, 12(1), p. e1005339. doi: 10.1371/journal.ppat.1005339.
- Lunning, M. A. and Vose, J. M. (2017) 'Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: the many-faced lymphoma', *Blood*, 129(9), pp. 1095–1102. doi: 10.1182/blood-2016-09-692541.
- M. A. Epstein, B. G. Achong, and Y. M. B. (1964) *VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA*, *Lancet Lond Engl*. doi: 10.1016/S0140-6736(64)91524-7.
- Manet, E., Sergeant, A. and Gruffat, H. (2003) 'Cycle productif du virus d'Epstein-Barr : rôle de la protéine virale EB1 dans l'activation du cycle productif et interactions protéine EB1-cellules hôte', *John Libbey*, 7(2), pp. 111–23.
- Mannick, J. B. *et al.* (1991) 'The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation', *Journal of Virology*, 65(12), pp. 6826–6837. doi: 10.1128/jvi.65.12.6826-6837.1991.
- Marques-Piubelli, M. L. *et al.* (2020) 'Epstein–Barr virus-associated B-cell lymphoproliferative disorders and lymphomas: a review', *Pathology*, 52(1), pp. 40–52. doi: 10.1016/j.pathol.2019.09.006.
- Marquitz, A. R. *et al.* (2015) 'Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI A Rightward Transcript Region', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 89(22), pp. 11256–11268. doi: 10.1128/JVI.01492-15.
- Marquitz, A. R. and Raab-Traub, N. (2012) 'The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC', *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), pp. 166–172. doi: 10.1016/j.semcan.2011.12.001.
- de Martel, C., Forman, D. and Plummer, M. (2013) 'Gastric Cancer', *Gastroenterology Clinics of North America*, 42(2), pp. 219–240. doi: 10.1016/j.gtc.2013.01.003.
- Maruo, S. *et al.* (2011) 'Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16 INK4A and p14 ARF expression', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(5), pp. 1919–1924. doi: 10.1073/pnas.1019599108.
- McClellan, M. J. *et al.* (2012) 'Downregulation of Integrin Receptor-Signaling Genes by Epstein-Barr Virus EBNA 3C via Promoter-Proximal and -Distal Binding Elements', *Journal of Virology*, 86(9), pp. 5165–5178. doi: 10.1128/JVI.07161-11.
- Mckenzie, J. and El-Guindy, A. (2015) 'Epstein-Barr virus lytic cycle reactivation', in *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 237–261. doi: 10.1007/978-3-319-22834-1_8.
- Meckes, D. G. *et al.* (2010) 'Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(47), pp. 20370–20375. doi: 10.1073/pnas.1014194107.
- Meckes, D. G. *et al.* (2013) 'Modulation of B-cell exosome proteins by gamma herpesvirus infection', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(31). doi: 10.1073/pnas.1303906110.
- Minciacchi, V. R., Freeman, M. R. and Di Vizio, D. (2015) 'Extracellular Vesicles in Cancer:

Exosomes, Microvesicles and the Emerging Role of Large Oncosomes', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 40, pp. 41–51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.

Mittelbrunn, M. and Sánchez-Madrid, F. (2012) 'Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(5), pp. 328–335. doi: 10.1038/nrm3335.

Molyneux, E. M. *et al.* (2012) 'Burkitt's lymphoma', *The Lancet*. Elsevier B.V., 379(9822), pp. 1234–1244. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61177-X.

Morales-Sánchez, A. and Fuentes-Panana, E. (2018) 'The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis', *Cancers*, 10(4), p. 98. doi: 10.3390/cancers10040098.

Morris, M. A. *et al.* (2016) 'The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF β and β 1 integrin signalling', *Scientific Reports*, 6(1), p. 19533. doi: 10.1038/srep19533.

Morscio, J. and Tousseyn, T. (2016) 'Recent insights in the pathogenesis of post-transplantation lymphoproliferative disorders', *World Journal of Transplantation*, 6(3), p. 505. doi: 10.5500/wjt.v6.i3.505.

Mrad, M. F. *et al.* (2021) 'Exosomes From Subjects With Multiple Sclerosis Express EBV-Derived Proteins and Activate Monocyte-Derived Macrophages', *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 8(4), p. e1004. doi: 10.1212/NXI.0000000000001004.

Mueller, N. E. *et al.* (2012) 'Antibody titers against EBNA1 and EBNA2 in relation to Hodgkin lymphoma and history of infectious mononucleosis', *International Journal of Cancer*, 130(12), pp. 2886–2891. doi: 10.1002/ijc.26334.

Mulcahy, L. A., Pink, R. C. and Carter, D. R. F. (2014) 'Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake', *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), p. 24641. doi: 10.3402/jev.v3.24641.

Münz, C. (2014) 'Dendritic cells during Epstein Barr virus infection.', *Frontiers in microbiology*, 5(3–4), p. 308. doi: 10.3389/fmicb.2014.00308.

Münz, C. (2019) 'Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis', *Nature Reviews Microbiology*. Springer US, 17(11), pp. 691–700. doi: 10.1038/s41579-019-0249-7.

Murata, T. (2018) 'Encyclopedia of EBV-Encoded Lytic Genes: An Update', in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 395–412. doi: 10.1007/978-981-10-7230-7_18.

Murphy, G. *et al.* (2009) 'Meta-analysis Shows That Prevalence of Epstein–Barr Virus-Positive Gastric Cancer Differs Based on Sex and Anatomic Location', *Gastroenterology*, 137(3), pp. 824–833. doi: 10.1053/j.gastro.2009.05.001.

Muthu, S. *et al.* (2021) 'Exosomal therapy—a new frontier in regenerative medicine', *Stem Cell Investigation*, 8, pp. 7–7. doi: 10.21037/sci-2020-037.

Nakhoul, H. *et al.* (2019) 'High-Throughput Sequence Analysis of Peripheral T-Cell Lymphomas Indicates Subtype-Specific Viral Gene Expression Patterns and Immune Cell Microenvironments', *mSphere*. Edited by B. Damania, 4(4). doi: 10.1128/mSphere.00248-19.

Navari, M. *et al.* (2018) 'Pathobiologic Roles of Epstein–Barr Virus-Encoded MicroRNAs in Human Lymphomas', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), p. 1168. doi:

10.3390/ijms19041168.

Nazarenko, I. *et al.* (2010) 'Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation', *Cancer Research*, 70(4), pp. 1668–1678. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-2470.

Neparidze, N. and Lacy, J. (2014) 'Malignancies associated with Epstein-Barr virus: Pathobiology, clinical features, and evolving treatments', *Clinical Advances in Hematology and Oncology*, 12(6), pp. 358–371.

Ng, S.-B. *et al.* (2018) 'Epstein-Barr virus-associated primary nodal T/NK-cell lymphoma shows a distinct molecular signature and copy number changes', *Haematologica*, 103(2), pp. 278–287. doi: 10.3324/haematol.2017.180430.

Nguyen, T. B. *et al.* (2020) 'Dasatinib Is an Effective Treatment for Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma', *Cancer Research*, 80(9), pp. 1875–1884. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-19-2787.

van Niel, G., D'Angelo, G. and Raposo, G. (2018) 'Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 19(4), pp. 213–228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Nilsson, J. *et al.* (2009) 'Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer', *British Journal of Cancer*, 100(10), pp. 1603–1607. doi: 10.1038/sj.bjc.6605058.

Nkosi, D. *et al.* (2020) 'Epstein-Barr virus LMP1 manipulates the content and functions of extracellular vesicles to enhance metastatic potential of recipient cells', *PLOS Pathogens*. Edited by A. V. Moses, 16(12), p. e1009023. doi: 10.1371/journal.ppat.1009023.

O'Connor, O. A. *et al.* (2019) 'Oral 5-azacytidine and romidepsin exhibit marked activity in patients with PTCL: a multicenter phase 1 study', *Blood*, 134(17), pp. 1395–1405. doi: 10.1182/blood.2019001285.

Ogawa, Y. *et al.* (2008) 'Exosome-Like Vesicles with Dipeptidyl Peptidase IV in Human Saliva', *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(6), pp. 1059–1062. doi: 10.1248/bpb.31.1059.

Ok, C. Y. *et al.* (2013) 'EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly', *Blood*, 122(3), pp. 328–340. doi: 10.1182/blood-2013-03-489708.

Onaindia, A., Medeiros, L. J. and Patel, K. P. (2017) 'Clinical utility of recently identified diagnostic, prognostic, and predictive molecular biomarkers in mature B-cell neoplasms', *Modern Pathology*, 30(10), pp. 1338–1366. doi: 10.1038/modpathol.2017.58.

Ontiveros, E. P. *et al.* (2014) 'A new model of LMP1–MYC interaction in B cell lymphoma', *Leukemia & Lymphoma*, 55(12), pp. 2917–2923. doi: 10.3109/10428194.2014.900762.

Oon, M. L. *et al.* (2021) 'T-Cell Lymphoma Clonality by Copy Number Variation Analysis of T-Cell Receptor Genes', *Cancers*, 13(2), p. 340. doi: 10.3390/cancers13020340.

Oyama, T. *et al.* (2003) 'Senile EBV+ B-Cell Lymphoproliferative Disorders', *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(1), pp. 16–26. doi: 10.1097/00000478-200301000-00003.

Palazzolo, S. *et al.* (2018) 'The Clinical Translation of Organic Nanomaterials for Cancer Therapy: A Focus on Polymeric Nanoparticles, Micelles, Liposomes and Exosomes', *Current Medicinal Chemistry*, 25(34), pp. 4224–4268. doi: 10.2174/0929867324666170830113755.

Pan, B.-T. and Johnstone, R. M. (1983) 'Fate of the transferrin receptor during maturation of

sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor', *Cell*, 33(3), pp. 967–978. doi: 10.1016/0092-8674(83)90040-5.

Parker, B. D. *et al.* (1990) 'Sequence and Transcription of Raji Epstein-Barr Spanning the B95-8 Deletion Region Virus DNA DNA sequencing', *Virology*, 346, pp. 339–346. doi: 10.1016/0042-6822(90)90302-8.

Paschos, K. *et al.* (2012) 'BIM promoter directly targeted by EBNA3C in polycomb-mediated repression by EBV', *Nucleic Acids Research*, 40(15), pp. 7233–7246. doi: 10.1093/nar/gks391.

Paschos, K. *et al.* (2019) 'Requirement for PRC1 subunit BMI1 in host gene activation by Epstein-Barr virus protein EBNA3C', *Nucleic Acids Research*, 47(6), pp. 2807–2821. doi: 10.1093/nar/gky1323.

Pegtel, D. M. *et al.* (2005) 'Epstein-Barr-Virus-Encoded LMP2A Induces Primary Epithelial Cell Migration and Invasion: Possible Role in Nasopharyngeal Carcinoma Metastasis', *Journal of Virology*, 79(24), pp. 15430–15442. doi: 10.1128/JVI.79.24.15430-15442.2005.

Pegtel, D. M. *et al.* (2010) 'Functional delivery of viral miRNAs via exosomes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14), pp. 6328–6333. doi: 10.1073/pnas.0914843107.

Pegtel, D. M., van de Garde, M. D. B. and Middeldorp, J. M. (2011) 'Viral miRNAs exploiting the endosomal-exosomal pathway for intercellular cross-talk and immune evasion', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier B.V., 1809(11–12), pp. 715–721. doi: 10.1016/j.bbagr.2011.08.002.

Pfeffer, S. *et al.* (2004) 'Identification of Virus-Encoded MicroRNAs', *Science*, 304(5671), pp. 734–736. doi: 10.1126/science.1096781.

Polack, A. *et al.* (1996) 'c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(19), pp. 10411–10416. doi: 10.1073/pnas.93.19.10411.

Portal, D. *et al.* (2013) 'Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein localizes to promoters and enhancers with cell transcription factors and EBNA2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46), pp. 18537–18542. doi: 10.1073/pnas.1317608110.

Price, A. M. and Luftig, M. A. (2014) 'Dynamic Epstein-Barr virus gene expression on the path to B-cell transformation.', *Advances in virus research*, 88, pp. 279–313. doi: 10.1016/B978-0-12-800098-4.00006-4.

Price, A. M. and Luftig, M. A. (2015) 'To Be or Not IIb: A Multi-Step Process for Epstein-Barr Virus Latency Establishment and Consequences for B Cell Tumorigenesis', *PLOS Pathogens*. Edited by R. C. Condit, 11(3), p. e1004656. doi: 10.1371/journal.ppat.1004656.

Pro, B. *et al.* (2020) 'Duvelisib in Patients with Relapsed/Refractory Peripheral T-Cell Lymphoma from the Phase 2 Primo Trial: Dose Optimization Efficacy Update and Expansion Phase Initial Results', *Blood*, 136(Supplement 1), pp. 38–39. doi: 10.1182/blood-2020-140412.

Qadir, F. *et al.* (2018) 'Transcriptome reprogramming by cancer exosomes: identification of novel molecular targets in matrix and immune modulation', *Molecular Cancer*. *Molecular Cancer*, 17(1), p. 97. doi: 10.1186/s12943-018-0846-5.

Qiu, J. *et al.* (2015) 'The Epstein-Barr Virus Encoded BART miRNAs Potentiate Tumor Growth In Vivo', *PLOS Pathogens*. Edited by E. K. Flemington, 11(1), p. e1004561. doi:

10.1371/journal.ppat.1004561.

Quintanilla-Martinez, L. *et al.* (2000) 'Fulminant EBV(+) T-cell lymphoproliferative disorder following acute/chronic EBV infection: a distinct clinicopathologic syndrome.', *Blood*, 96(2), pp. 443–51. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10887104>.

Raab-Traub, N. (2015) 'Nasopharyngeal Carcinoma: An Evolving Role for the Epstein-Barr Virus.', *Current topics in microbiology and immunology*, 390(Pt 1), pp. 339–63. doi: 10.1007/978-3-319-22822-8_14.

Ramachandran, S. and Palanisamy, V. (2012) 'Horizontal transfer of RNAs: exosomes as mediators of intercellular communication', *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 3(2), pp. 286–293. doi: 10.1002/wrna.115.

Ramayanti, O. *et al.* (2019) 'Vesicle-bound EBV-BART13-3p miRNA in circulation distinguishes nasopharyngeal from other head and neck cancer and asymptomatic EBV-infections', *International Journal of Cancer*, 144(10), pp. 2555–2566. doi: 10.1002/ijc.31967.

Ranger-Rogez, S. (2021) 'EBV Genome Mutations and Malignant Proliferations', in *Intech*, pp. 225–240. doi: 10.5772/intechopen.93194.

Ribeiro, J. *et al.* (2017) 'Epstein–Barr virus gene expression and latency pattern in gastric carcinomas: a systematic review', *Future Oncology*, 13(6), pp. 567–579. doi: 10.2217/fon-2016-0475.

Robertson, E. S. *et al.* (1995) 'Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa.', *Journal of virology*, 69(5), pp. 3108–16. doi: 10.1128/JVI.69.5.3108-3116.1995.

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).', *Journal of virology*, 70(5), pp. 3068–74. doi: 10.1128/JVI.70.5.3068-3074.1996.

Rojas, J. M. *et al.* (2017) 'IL-10: A multifunctional cytokine in viral infections', *Journal of Immunology Research*, 2017. doi: 10.1155/2017/6104054.

Roma-Rodrigues, C., Fernandes, A. R. and Baptista, P. V. (2014) 'Exosome in Tumour Microenvironment: Overview of the Crosstalk between Normal and Cancer Cells', *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation, 2014, pp. 1–10. doi: 10.1155/2014/179486.

Romero-Masters, J. C. *et al.* (2020) 'B cells infected with Type 2 Epstein-Barr virus (EBV) have increased NFATc1/NFATc2 activity and enhanced lytic gene expression in comparison to Type 1 EBV infection', *PLOS Pathogens*. Edited by S. Swaminathan, 16(2), p. e1008365. doi: 10.1371/journal.ppat.1008365.

Rosa, M. D. *et al.* (1981) 'Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII.', *Molecular and cellular biology*, 1(9), pp. 785–96. doi: 10.1128/mcb.1.9.785-796.1981.

Rosemarie, Q. and Sugden, B. (2020) 'Epstein–Barr Virus: How Its Lytic Phase Contributes to Oncogenesis', *Microorganisms*, 8(11), p. 1824. doi: 10.3390/microorganisms8111824.

Ryder, J. *et al.* (2007) 'Aggressive Natural Killer Cell Leukemia: Report of a Chinese Series and Review of the Literature', *International Journal of Hematology*, 85(1), pp. 18–25. doi: 10.1532/IJH97.A10612.

- Sadeghipour, S. and Mathias, R. A. (2017) 'Herpesviruses hijack host exosomes for viral pathogenesis', *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 67, pp. 91–100. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.03.005.
- Saha, A. and Robertson, E. S. (2019) 'Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus', *Journal of Virology*. Edited by F. Goodrum, 93(13). doi: 10.1128/JVI.00238-19.
- 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(30), pp. 4150–4160. doi: 10.1038/onc.2008.75.
- Sathish, N., Wang, X. and Yuan, Y. (2012) 'Tegument proteins of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and related gamma-herpesviruses', *Frontiers in Microbiology*, 3(MAR), pp. 1–13. doi: 10.3389/fmicb.2012.00098.
- Sathiyamoorthy, K. *et al.* (2017) 'The COMPLEXity in herpesvirus entry', *Current Opinion in Virology*. Elsevier B.V., 24, pp. 97–104. doi: 10.1016/j.coviro.2017.04.006.
- Schmitz, R. *et al.* (2012) 'Burkitt lymphoma pathogenesis and therapeutic targets from structural and functional genomics', *Nature*, 490(7418), pp. 116–120. doi: 10.1038/nature11378.
- Schorey, J. S. *et al.* (2015) 'Exosomes and other extracellular vesicles in host–pathogen interactions', *EMBO reports*. EMBO, 16(1), pp. 24–43. doi: 10.15252/embr.201439363.
- Schorey, J. S. and Bhatnagar, S. (2008) 'Exosome Function: From Tumor Immunology to Pathogen Biology', *Traffic*, 9(6), pp. 871–881. doi: 10.1111/j.1600-0854.2008.00734.x.
- Shanbhag, S. and Ambinder, R. F. (2018) 'Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress', *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(2), pp. 116–132. doi: 10.3322/caac.21438.
- Shannon-Lowe, C. and Rickinson, A. (2019) 'The Global Landscape of EBV-Associated Tumors', *Frontiers in Oncology*, 9(August), pp. 1–23. doi: 10.3389/fonc.2019.00713.
- Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B. and Bell, A. I. (2017) 'Epstein–Barr virus-associated lymphomas', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), p. 20160271. doi: 10.1098/rstb.2016.0271.
- Shibusawa, M., Kidoguchi, K. and Tanimoto, T. (2021) 'Epstein-Barr Virus-Positive Diffuse Large B Cell Lymphoma', in *Lymphoma*. Exon Publications, pp. 27–46. doi: 10.36255/exon-publications.lymphoma.2021.ebv-dlbcl.
- Sinclair, A. J. *et al.* (1994) 'EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus.', *The EMBO Journal*. Wiley-VCH Verlag, 13(14), pp. 3321–3328. doi: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06634.x.
- Singavi, A. K., Harrington, A. M. and Fenske, T. S. (2015) 'Post-transplant lymphoproliferative disorders.', *Cancer treatment and research*, 165, pp. 305–27. doi: 10.1007/978-3-319-13150-4_13.
- Sionov, R. V., Vlahopoulos, S. A. and Granot, Z. (2015) 'Regulation of Bim in Health and Disease', *Oncotarget*. Impact Journals, LLC, 6(27), pp. 23058–23134. doi: 10.18632/oncotarget.5492.
- Sivachandran, N., Wang, X. and Frappier, L. (2012) 'Functions of the Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein in Viral Reactivation and Lytic Infection', *Journal of Virology*, 86(11), pp. 6146–6158. doi: 10.1128/jvi.00013-12.
- Skalska, L. *et al.* (2010) 'Epigenetic Repression of p16INK4A by Latent Epstein-Barr Virus

Requires the Interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP', *PLoS Pathogens*. Edited by S. H. Speck, 6(6), p. e1000951. doi: 10.1371/journal.ppat.1000951.

Skalska, L. *et al.* (2013) 'Induction of p16INK4a Is the Major Barrier to Proliferation when Epstein-Barr Virus (EBV) Transforms Primary B Cells into Lymphoblastoid Cell Lines', *PLoS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 9(2), p. e1003187. doi: 10.1371/journal.ppat.1003187.

Skalsky, R. L. (2017) 'Analysis of Viral and Cellular MicroRNAs in EBV-Infected Cells.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1532, pp. 133–146. doi: 10.1007/978-1-4939-6655-4_9.

Skare, J. *et al.* (1982) 'The B95-8 Isolate of Epstein-Barr Virus Arose from an Isolate with a Standard Genome', 44(3), pp. 1088–1091.

Skinner, C. M. *et al.* (2017) 'An Epstein-Barr Virus MicroRNA Blocks Interleukin-1 (IL-1) Signaling by Targeting IL-1 Receptor 1', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 91(21). doi: 10.1128/JVI.00530-17.

Smatti, Maria K. *et al.* (2018) 'Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update', *Frontiers in Oncology*, 8. doi: 10.3389/fonc.2018.00211.

Smatti, Maria K *et al.* (2018) 'Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update', *Frontiers in Oncology*, 8(June). doi: 10.3389/fonc.2018.00211.

Smith, D. W. and Sugden, B. (2013) 'Potential Cellular Functions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) of Epstein-Barr Virus', *Viruses*, 5, pp. 226–240. doi: 10.3390/v5010226.

Smith, N. A. *et al.* (2020) 'CD21 (Complement Receptor 2) Is the Receptor for Epstein-Barr Virus Entry into T Cells', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 94(11), pp. 1–13. doi: 10.1128/JVI.00428-20.

Smith, P. R. *et al.* (2000) 'Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus', *Journal of Virology*, 74(7), pp. 3082–3092. doi: 10.1128/JVI.74.7.3082-3092.2000.

Straus, M. S. E. and Cohen, D. J. I. (1993) 'Epstein-Barr Virus Infections : Biology , Pathogenesis , and Management', *Annals of Internal Medicine.*, 118(1), pp. 45–58.

Strong, M. J. *et al.* (2013) 'Differences in Gastric Carcinoma Microenvironment Stratify According to EBV Infection Intensity: Implications for Possible Immune Adjuvant Therapy', *PLoS Pathogens*. Edited by P. M. Lieberman, 9(5), p. e1003341. doi: 10.1371/journal.ppat.1003341.

Strong, M. J. *et al.* (2015) 'Latent Expression of the Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded Major Histocompatibility Complex Class I TAP Inhibitor, BNLF2a , in EBV-Positive Gastric Carcinomas', *Journal of Virology*. Edited by R. M. Longnecker, 89(19), pp. 10110–10114. doi: 10.1128/JVI.01110-15.

Stuffers, S. *et al.* (2009) 'Multivesicular Endosome Biogenesis in the Absence of ESCRTs', *Traffic*, 10(7), pp. 925–937. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00920.x.

Swain, S. K. *et al.* (2020) 'Nasopharyngeal carcinoma among the pediatric patients in a non-endemic region: our experience at a tertiary care teaching hospital in Eastern India', *Egyptian Pediatric Association Gazette*, 68(1), p. 23. doi: 10.1186/s43054-020-00036-w.

Swerdlow, S. H. *et al.* (2016) 'The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms', *Blood*, 127(20), pp. 2375–2390. doi: 10.1182/blood-2016-01-643569.

- Szymula, A. *et al.* (2018) 'Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-LP is essential for transforming naïve B cells, and facilitates recruitment of transcription factors to the viral genome', *PLOS Pathogens*. Edited by E. K. Flemington, 14(2), p. e1006890. doi: 10.1371/journal.ppat.1006890.
- Tang, Y.-T. *et al.* (2017) 'Comparison of isolation methods of exosomes and exosomal RNA from cell culture medium and serum', *International Journal of Molecular Medicine*, 40(3), pp. 834–844. doi: 10.3892/ijmm.2017.3080.
- Tang, Y. *et al.* (2016) 'Expression of LMP and EBNA genes in Epstein-Barr virus-associated lymphomas in Hu-PBL/SCID mice', *Oncology Reports*, 35(2), pp. 905–911. doi: 10.3892/or.2015.4401.
- Tangye, S. G., Palendira, U. and Edwards, E. S. J. (2017) 'Human immunity against EBV — lessons from the clinic', *J Exp Med*, 214(12), pp. 269–283.
- Tari, G., Lemonnier, F. and Morschhauser, F. (2021) 'Epigenetic focus on angioimmunoblastic T-cell lymphoma: pathogenesis and treatment', *Current Opinion in Oncology*, 33(5), pp. 400–405. doi: 10.1097/CCO.0000000000000773.
- Tashiro, H. and Brenner, M. K. (2017) 'Immunotherapy against cancer-related viruses', *Cell Research*. Nature Publishing Group, 27(1), pp. 59–73. doi: 10.1038/cr.2016.153.
- Teow, S.-Y. *et al.* (2017) 'Pathogenic Role of Exosomes in Epstein-Barr Virus (EBV)-Associated Cancers', *International Journal of Biological Sciences*, 13(10), pp. 1276–1286. doi: 10.7150/ijbs.19531.
- Théry, C. *et al.* (1999) 'Molecular Characterization of Dendritic Cell-Derived Exosomes', *Journal of Cell Biology*, 147(3), pp. 599–610. doi: 10.1083/jcb.147.3.599.
- Théry, C. *et al.* (2001) 'Proteomic Analysis of Dendritic Cell-Derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles', *The Journal of Immunology*, 166(12), pp. 7309–7318. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309.
- Théry, C. (2011) 'Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications', *F1000 Biology Reports*, 3. doi: 10.3410/B3-15.
- Timmins, M. A., Wagner, S. D. and Ahearne, M. J. (2020) 'The new biology of PTCL-NOS and AITL: current status and future clinical impact', *British Journal of Haematology*, 189(1), pp. 54–66. doi: 10.1111/bjh.16428.
- Trajkovic, K. *et al.* (2008) 'Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes', *Science*, 319(5867), pp. 1244–1247. doi: 10.1126/science.1153124.
- Tremat, P. *et al.* (2002) 'Evidence for Early Infection of Nonneoplastic Natural Killer Cells by Epstein-Barr Virus', *JOURNAL OF VIROLOGY*, 76(21), pp. 11139–11142. doi: 10.1128/JVI.76.21.11139.
- Tsai, S.-C. *et al.* (2013) 'Autocrine CCL3 and CCL4 Induced by the Oncoprotein LMP1 Promote Epstein-Barr Virus-Triggered B Cell Proliferation', *Journal of Virology*, 87(16), pp. 9041–9052. doi: 10.1128/JVI.00541-13.
- Tsao, S. W., Tsang, C. M. and Lo, K. W. (2017) 'Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1732), p. 20160270. doi: 10.1098/rstb.2016.0270.

- Tsoukas, C. D. and Lambris, J. D. (1988) 'Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies', *European Journal of Immunology*, 18(8), pp. 1299–1302. doi: 10.1002/eji.1830180823.
- Tugizov, S. M., Berline, J. W. and Palefsky, J. M. (2003) 'Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells', *Nature Medicine*, 9(3), pp. 307–314. doi: 10.1038/nm830.
- Tursiella, M. L. *et al.* (2014) 'Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3A Promotes Cellular Proliferation by Repression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor p21WAF1/CIP1', *PLoS Pathogens*. Edited by E. K. Flemington, 10(10), p. e1004415. doi: 10.1371/journal.ppat.1004415.
- Tzellos, S. *et al.* (2014) 'A Single Amino Acid in EBNA-2 Determines Superior B Lymphoblastoid Cell Line Growth Maintenance by Epstein-Barr Virus Type 1 EBNA-2', *Journal of Virology*. Edited by L. Hutt-Fletcher, 88(16), pp. 8743–8753. doi: 10.1128/JVI.01000-14.
- Tzellos, S. and Farrell, P. (2012) 'Epstein-Barr Virus Sequence Variation—Biology and Disease', *Pathogens*, 1(2), pp. 156–174. doi: 10.3390/pathogens1020156.
- Vazirabadi, G. *et al.* (2003) 'Epstein–Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) and lytic LMP-1 localization in plasma membrane-derived extracellular vesicles and intracellular virions', *Journal of General Virology*, 84(8), pp. 1997–2008. doi: 10.1099/vir.0.19156-0.
- Verhoeven, R. J. A. *et al.* (2019) 'Epstein-Barr Virus BART Long Non-coding RNAs Function as Epigenetic Modulators in Nasopharyngeal Carcinoma', *Frontiers in Oncology*, 9. doi: 10.3389/fonc.2019.01120.
- Verma, D. and Swaminathan, S. (2008) 'Epstein-Barr Virus SM Protein Functions as an Alternative Splicing Factor', *Journal of Virology*, 82(14), pp. 7180–7188. doi: 10.1128/JVI.00344-08.
- Villarroya-Beltri, C. *et al.* (2016) 'ISGylation controls exosome secretion by promoting lysosomal degradation of MVB proteins', *Nature Communications*, 7(1), p. 13588. doi: 10.1038/ncomms13588.
- Vlassov, A. V. *et al.* (2012) 'Exosomes: Current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1820(7), pp. 940–948. doi: 10.1016/j.bbagen.2012.03.017.
- Walker, J. D., Maier, C. L. and Pober, J. S. (2009) 'Cytomegalovirus-Infected Human Endothelial Cells Can Stimulate Allogeneic CD4 + Memory T Cells by Releasing Antigenic Exosomes', *The Journal of Immunology*, 182(3), pp. 1548–1559. doi: 10.4049/jimmunol.182.3.1548.
- Wang, D., Liebowitz, D. and Kieff, E. (1985) 'An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells.', *Cell*, 43(3 Pt 2), pp. 831–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3000618>.
- Wang, G. *et al.* (2012) 'Astrocytes Secrete Exosomes Enriched with Proapoptotic Ceramide and Prostate Apoptosis Response 4 (PAR-4)', *Journal of Biological Chemistry*, 287(25), pp. 21384–21395. doi: 10.1074/jbc.M112.340513.
- Wang, H.-B. *et al.* (2015) 'ARTICLE Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells'. doi: 10.1038/ncomms7240.
- Wang, K. *et al.* (2011) 'Exome sequencing identifies frequent mutation of ARID1A in molecular subtypes of gastric cancer', *Nature Genetics*, 43(12), pp. 1219–1223. doi: 10.1038/ng.982.

- Wang, L. *et al.* (2014) 'Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) protein induction of epithelial-mesenchymal transition in nasopharyngeal carcinoma cells', *Cancer*, 120(3), pp. 363–372. doi: 10.1002/cncr.28418.
- Wang, X. *et al.* (2012) 'Sequence analysis of Epstein-Barr virus EBNA-2 gene coding amino acid 148-487 in nasopharyngeal and gastric carcinomas', *Virology Journal*, 9(1), p. 49. doi: 10.1186/1743-422X-9-49.
- Wasil, L. R. *et al.* (2013) 'The Effect of Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2 Expression on the Kinetics of Early B Cell Infection', *PLoS ONE*. Edited by A. J. Sinclair, 8(1), p. e54010. doi: 10.1371/journal.pone.0054010.
- Weiss, L. M. *et al.* (1987) 'Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease.', *The American journal of pathology*, 129(1), pp. 86–91. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2821817>.
- White, R. E. *et al.* (2010) 'Extensive Co-Operation between the Epstein-Barr Virus EBNA3 Proteins in the Manipulation of Host Gene Expression and Epigenetic Chromatin Modification', *PLoS ONE*. Edited by M. G. Masucci, 5(11), p. e13979. doi: 10.1371/journal.pone.0013979.
- White, R. E. *et al.* (2012) 'EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors', *Journal of Clinical Investigation*, 122(4), pp. 1487–1502. doi: 10.1172/JCI58092.
- Willemsen, M. *et al.* (2018) 'Mutational heterogeneity of angioimmunoblastic T-cell lymphoma indicates distinct lymphomagenic pathways', *Blood Cancer Journal*, 8, p. 6. doi: 10.1038/s41408-017-0047-2.
- 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', *British Journal of Haematology*, 138(6), pp. 733–739. doi: 10.1111/j.1365-2141.2007.06725.x.
- Wood, C. D. *et al.* (2016) 'MYC activation and BCL2L1 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.18270.
- Wright, G. W. *et al.* (2020) 'A Probabilistic Classification Tool for Genetic Subtypes of Diffuse Large B Cell Lymphoma with Therapeutic Implications', *Cancer Cell*, 37(4), pp. 551-568.e14. doi: 10.1016/j.ccell.2020.03.015.
- Xia, T. *et al.* (2008) 'EBV MicroRNAs in Primary Lymphomas and Targeting of CXCL-11 by ebv-mir-BHRF1-3', *Cancer Research*, 68(5), pp. 1436–1442. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5126.
- Xu, G. *et al.* (2021) 'Viral tegument proteins restrict cGAS-DNA phase separation to mediate immune evasion', *Molecular Cell*, 81(13), pp. 2823-2837.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2021.05.002.
- Yamamoto, Norio *et al.* (2000) 'Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs', *FEBS Letters*, 484(2), pp. 153–158. doi: 10.1016/S0014-5793(00)02145-1.
- Yan, Q. *et al.* (2015) 'EBV-miR-BART10-3p facilitates epithelial-mesenchymal transition and promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting BTRC', *Oncotarget*, 6(39), pp. 41766–41782. doi: 10.18632/oncotarget.6155.
- Yin, H. *et al.* (2019) 'Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis', *Medical Microbiology and Immunology*, 208(5), pp. 573–583. doi: 10.1007/s00430-

018-0570-1.

Yokoyama, A. *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', *Journal of Virology*, 75(11), pp. 5119–5128. doi: 10.1128/JVI.75.11.5119-5128.2001.

Young *et al.* (2007) 'EBV gene expression and regulation.', in Arvin, A. *et al.* (eds) *In Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*. Cambridge University Press, Cambridge. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21348114>.

Young, L. S. and Rickinson, A. B. (2004) 'Epstein–Barr virus: 40 years on', *Nature Reviews Cancer*, 4(10), pp. 757–768. doi: 10.1038/nrc1452.

Zhang, J. *et al.* (2020) 'Long noncoding RNAs involvement in Epstein-Barr virus infection and tumorigenesis', *Virology Journal*. *Virology Journal*, 17(1), p. 51. doi: 10.1186/s12985-020-01308-y.

Zhang, Y. *et al.* (2019) 'Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential', *Cell & Bioscience*, 9(1), p. 19. doi: 10.1186/s13578-019-0282-2.

Zhao, M. *et al.* (2019) 'Extracellular Vesicles in Epstein-Barr Virus' Life Cycle and Pathogenesis', *Microorganisms*, 7(2), p. 48. doi: 10.3390/microorganisms7020048.

Zhao, Y. *et al.* (2021) 'Exosomes as Smart Nanoplatfoms for Diagnosis and Therapy of Cancer', *Frontiers in Oncology*. *Frontiers Media S.A.*, 11, p. 3364. doi: 10.3389/fonc.2021.743189.

Zheng, J. *et al.* (2019) 'Oncogenic effects of exosomes in γ -herpesvirus-associated neoplasms', *Journal of Cellular Physiology*, 234(11), pp. 19167–19179. doi: 10.1002/jcp.28573.

Zhou, Y. *et al.* (2018) 'Exosomes in Nasopharyngeal Carcinoma', *Journal of Cancer*, 9(5), pp. 767–777. doi: 10.7150/jca.22505.

Zhu, J. Y. *et al.* (2009) 'Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal Carcinomas', *Journal of Virology*, 83(7), pp. 3333–3341. doi: 10.1128/JVI.01689-08.

Zuo, L.-L. *et al.* (2014) '[The entry of Epstein-Barr virus into B lymphocytes and epithelial cells during infection].', *Bing du xue bao = Chinese journal of virology*, 30(4), pp. 476–82. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25272606>.

Analyse du transcriptome du virus d'Epstein-Barr (EBV) par séquençage de nouvelle génération (NGS) dans les cellules et les exosomes de lymphomes humains et particulièrement de lymphome T angio-immunoblastique (LAI)

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), herpèsvirus oncogène, est associé à des carcinomes et lymphomes B ou T. Le lymphome T angio-immunoblastique (LAI) porte l'EBV dans 90% des cas sans qu'on sache quel rôle il y joue. Les exosomes, petites vésicules liées à la membrane, transportent un grand nombre de molécules pour favoriser la communication intercellulaire. L'EBV pourrait utiliser les exosomes pour contribuer au développement et à la dissémination de néoplasies.

Afin d'éclaircir ces points, nous avons étudié le transcriptome de l'EBV dans les adénopathies de 14 LAI et 21 autres lymphomes B et T, ainsi que de 11 lignées cellulaires, puis dans les exosomes de ces mêmes lignées. Un séquençage de nouvelle génération (NGS) avec technique de capture des ARN viraux a été réalisé. Les « reads » obtenus ont été alignés contre le génome de l'EBV et normalisés en transcrits par million (TPM).

Les transcrits BART étaient les transcrits de latence les plus exprimés dans les LAI suggérant qu'ils jouent un rôle dans cette pathologie. Les LAI présentaient une latence de type IIc avec expression de *BNLF2a* et des protéines de latence II. L'expression simultanée de *BCRF1*, interleukine-10 virale, et de *BNLF2a*, bloquant la présentation antigénique aux lymphocytes T cytotoxiques, pourrait participer à la survie des cellules tumorales infectées. Les transcrits de *BNLF2a* et *BKRF4*, protéines impliquées dans l'immunoévasion, ont été trouvés en abondance dans les exosomes de toutes les lignées. Les transcrits d'autres gènes, codant des protéines impliquées dans l'immunoévasion ou dans la prolifération cellulaire, ont aussi été trouvés à un taux élevé dans les exosomes de la plupart des lignées.

Les résultats obtenus laissent envisager une participation de l'EBV à la pathologie du LAI. Le virus pourrait utiliser les exosomes pour transporter des molécules permettant de renforcer sa participation dans l'oncogenèse et sa fonction dans l'échappement au système immunitaire.

Mots-clés : virus d'Epstein-Barr, EBV, lymphome T angio-immunoblastique, LAI, exosome, immunoévasion, oncogenèse, séquençage, NGS.

Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) transcriptome by next generation sequencing (NGS) in human lymphoma cells and exosomes, particularly in angioimmunoblastic T cell lymphoma (AITL)

The Epstein-Barr virus (EBV), an oncogenic herpesvirus, is associated with carcinomas and B or T lymphomas. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma (AITL) is associated with EBV in 90% of cases, but its role is unknown. Exosomes, small membrane-bound vesicles, carry a large number of molecules to promote intercellular communication. The EBV could use exosomes to contribute to the development and dissemination of neoplasms.

To clarify these points, we studied the EBV transcriptome in adenopathies of 14 AITLs and 21 other B and T lymphomas, as well as 11 cell lines, then in exosomes of the same cell lines. Next-generation sequencing (NGS) with capture technique of viral RNAs was performed. The reads obtained were aligned against the EBV genome and normalized to transcripts per million (TPM).

BART transcripts were the most expressed latency transcripts in AITLs, suggesting they play a role in this pathology. AITLs showed a latency type IIc with *BNLF2a* expression and latency II proteins. Simultaneous expression of *BCRF1*, a viral interleukin-10, and *BNLF2a*, which blocks antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes, may be involved in the survival of infected tumor cells. Transcripts of *BNLF2a* and *BKRF4*, proteins involved in immunoevasion, were found in abundance in exosomes of all cell lines. Transcripts of other genes, which encode proteins involved in immunoevasion or cell proliferation, were also found at high levels in exosomes of most cell lines.

These results suggest the involvement of EBV in the pathology of AITL. The virus could use exosomes to transport molecules in order to reinforce its participation in oncogenesis and its function in immune escape.

Keywords: Epstein-Barr virus, EBV, angioimmunoblastic T-cell lymphoma, AITL, exosome, immunoevasion, oncogenesis, sequencing, NGS.

