

Rôle des variants de la protéine de latence LMP du virus d'Epstein-Barr dans le développement du lymphome de Hodgkin chez les personnes VIH+

Charlotte Sueur

► To cite this version:

Charlotte Sueur. Rôle des variants de la protéine de latence LMP du virus d'Epstein-Barr dans le développement du lymphome de Hodgkin chez les personnes VIH+. Médecine humaine et pathologie. Université de Grenoble, 2013. Français. NNT: 2013GRENV077. tel-01553295

HAL Id: tel-01553295 https://theses.hal.science/tel-01553295

Submitted on 3 Jul 2017 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Virologie, Microbiologie, Immunologie Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Charlotte SUEUR

Thèse dirigée par Véronique BOYER codirigée par Patrice MORAND

préparée au sein **de l'UVHCI (Unit for Virus Host-Cell** Interactions, UMI-3265 UJF, EMBL, CNRS) dans l'École Doctorale de Chimie et Sciences du Vivant

Rôle des variants de la protéine de latence LMP1 du virus d'Epstein Barr dans le développement du lymphome de Hodgkin chez les personnes VIH+

Thèse soutenue publiquement le **10 octobre 2013**, devant le jury composé de :

Mme Evelyne MANET DR2, ENS-Lyon, Président Mme Samira FAFI-KREMER PU-PH, CHRU de Strasbourg, rapporteur Mme Caroline BESSON MCU-PH, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, rapporteur Mme Véronique BOYER CR1, SESSTIM, Marseille, membre Mr Patrice MORAND PU-PH, CHU de Grenoble, membre

Université Joseph Fourier / Université Pierre Mendès France / Université Stendhal / Université de Savoie / Grenoble INP



Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mes directeurs de thèse et aux membres du jury :

Véronique Boyer, j'ai vraiment apprécié ces 5 années passées ensemble à l'UVHCI. Tu m'as transmis le goût de la recherche, tu as fait mon éducation scientifique, tu m'as guidée, conseillée et soutenue pendant mon M2R puis ma thèse. J'ai appris plein de choses avec toi et je t'en remercie !

Patrice Morand, merci de m'avoir encouragée sur la voie de la recherche pendant mon internat de pharmacie. Nous avons bien travaillé ensemble sur le séquençage et j'espère que notre collaboration sera longue et prospère.

Caroline Besson, je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Participer à la cohorte Lymphovir a été pour moi une réelle chance de découvrir la recherche clinique et de m'investir dans un projet multidisciplinaire.

Samira Fafi-Kremer, je vous remercie également d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Votre parcours et votre travail ont été un exemple pour moi. Je suis heureuse de rejoindre votre équipe à Strasbourg.

Evelyne Manet, merci d'être présente aujourd'hui et de présider ma soutenance de thèse. Nous avons collaboré pendant toutes ces années sur plusieurs projets, ton aide et tes conseils ont toujours été précieux.

Je remercie ensuite Rob Ruigrok et Wim Burmeister de m'avoir accueillie pour faire de la recherche dans un environnement scientifique excellent et toujours agréable grâce à Nolwenn, Eric, Audrey, Catherine, Nicolas T. et tous les autres collègues de l'UVHCI...

Merci à Raphaële et Laurence pour votre aide avec les échantillons cliniques, Sylvie et Katia pour votre aide sur le séquençage et Julien pour prendre le relai. Et surtout merci à tout le labo de virologie pour votre accueil et votre bonne humeur !

Je voudrais remercier encore toutes les personnes avec qui nous avons collaboré et qui m'ont aidée à faire avancer ce projet : Henri Gruffat, Philippe Mas, les infirmières du CISIH, JF Mayol, Jean-Philippe Kleman, Françoise Lacroix, Anne Signori-Schmuck, Jean Feuillard et Nathalie Faumont, et les différents collaborateurs de la cohorte Lymphovir.

Un grand merci à mes parents, à toute ma famille et à mes amis qui m'ont encouragée jusqu'au bout, avec une pensée spéciale pour ma maman qui m'a soutenue dans les moments difficiles de la rédaction.

Et le meilleur pour la fin, Lucien et notre petit Timothée ont tous les deux grandement participé à ce travail. Merci pour votre présence...

TABLE DES MATIERES

Tak	ole c	les matières	p.1
List	te de	es abréviations	p.5
Tab	ole c	les figures	p.6
Tab	ole c	des tableaux	p.8
Tab	ole c	les annexes	p.9
IN	rro	DUCTION	p.11
			n 11
<u>Le</u>	viru Ci	<u>s a Epstein-Barr (EBV)</u>	p.11
ι.	1	eneralites Déseuverte du Virus d'Enstein Perr	p.11
	1. 2	Structure d'ERV	p.11
	2.		p.12
	э.	3.1. Primo-infection : Attachement et nénétration cellulaire	p.14
		3.2. Latence virale et protéines de latence	p.14
		3.2.1 Antigènes nucléaires FBNA	n 18
		3.2.2. Protéines de latence membranaires LMP	p.10
		3.2.3. ARN viraux	p.21
		3.3. Réplication virale et les protéines du cycle productif	p.22
П.	Pa	athologies associées à l'EBV	p.27
	1.	Mononucléose infectieuse	p.27
	2.	Lymphomes associés à l'EBV	p.28
		2.1. Lymphoproliférations induites par l'immunosuppression	p.28
		2.1.1. Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation	p.28
		2.1.2. Lymphomes des patients VIH-séropositifs	p.29
		2.2. Lymphomes des sujets immunocompétants	p.29
		2.2.1. Lymphome de Burkitt	p.29
		2.2.2. Lymphome de Hodgkin	p.30
		2.2.3. Lymphome des cellules T/NK	p.30
	3.	Carcinomes associés à l'EBV	p.31
		3.1. Carcinome indifférencié du cavum	p.31
		3.2. Cancer du sein	p.31
	_	3.3. Carcinome gastrique	p.32
	4.	Maladies auto-immunes	p.32
La	prot	téine de latence membranaire LMP1	p.33
Ι.	Ge	énéralités	p.33
	1.	Description	p.33
	2.	Structure	p.34

II.	Mécanisme d'action et potentiel oncogène de LMP1	p.35
	1. Domaines effecteurs et partenaires cellulaires de LMP1	p.35
	2. Voies de signalisation impliquées	p.38
	2.1. NF-кВ	p.38
	2.2. MAP kinases	p.38
	2.3. JAK/STAT	p.39
	2.4. PI3Kinases	p.40
	3. Propriétés de LMP1	p.40
	3.1. Altérations phénotypiques	p.40
	3.2. Prolifération cellulaire	p.41
	3.3. Différenciation cellulaire	p.42
	3.4. Régulation de l'apoptose et des gènes suppresseurs de tumeur	p.42
	3.5. Pouvoir métastatique	p.43
	3.6. Modulation de la réponse immune et de l'expression des cytokines	p.44
III.	Les variants de LMP1	p.45
	1. Polymorphisme de LMP1	p.45
	2. Les variants LMP1-del30 et LMP1-del69	p.46
	3. Activités fonctionnelles connues des variants de LMP1 délétés en C-terminal	p.47
Le	lymphome de Hodgkin	p.49
١.	Généralités	p.49
	1. Epidémiologie	p.49
	2. Diagnostic clinique et histologique	p.49
	3. Traitement – Pronostic	p.51
П.	Pathogenèse du lymphome de Hodgkin	p.53
	1. Origine des cellules HRS	, p.53
	2. Facteurs génétiques	p.53
	3. Voies de signalisation impliquées	p.54
	3.1. JAK-STAT	p.54
	3.2. NF-кВ	p.55
	4. Rôle des cytokines dans le développement du LH	p.58
	4.1. Microenvironnement tumoral	p.58
	4.2. Description des cytokines, chémokines	p.59
	4.2.1. Cytokines secrétées par les cellules HRS	p.60
	4.2.2. Cytokines exprimées par les cellules environnantes	p.61
	4.3. Rôle des cytokines dans la prolifération et la survie des cellules HRS	p.62
	4.4. Rôle des cytokines dans l'immunité cellulaire	p.62
	5. Rôle des agents infectieux : implication d'EBV	p.63
	5.1. Preuve de l'implication d'EBV dans le développement des LH	p.63
	5.2. Modifications histologiques dûes à l'EBV	p.65
	5.3. Rôle d'EBV et de LMP1 dans le développement des lymphomes de Hodgkin	p.65

III.	Lymphome de Hodgkin et VIH	p.67
	1. Epidémiologie	p.67
	2. Particularités des LH/VIH+	p.68
	2.1 Clinique	p.68
	2.2. Histologique	p.68
	2.3. Moléculaire	p.69
	2.4. Traitement et pronostic	p.69
	3. Rôle du VIH	p.70
	4. Association à l'EBV	p.70

|--|

MA	TERIELS ET METHODES	p.75
Ι.	Biologie cellulaire	p.75
	1. Culture cellulaire	p.75
	2. Etablissement des 293-HEK-EBV-GFP	p.75
	3. Production de particules virales infectieuses	p.76
	4. Cytométrie de flux	p.76
II.	Biologie moléculaire	p.76
	1. Mutagenèse par PCR chevauchante	p.76
	2. Clonage	p.79
	1. Recombinaison homologue	p.79
	2. Extraction d'ADN	p.82
	3. RT-PCR	p.82
	4. PCR	p.83
<u>RES</u>	ULTATS	p.84
Ι.	Etablissement d'une lignée cellulaire de lymphome de Hodgkin EBV-positive	p.84
	1. Choix du modèle cellulaire	p.84
	2. Etablissement d'une lignée KMH2-EBV	p.85
	3. Caractérisation des KMH2-EBV	p.86
II.	Etablissement de lignées cellulaires KMH2 exprimant LMP1 de façon inductible	p.88
	1. Présentation de l'article	p.88
	2. Article	p.88

PA	RTIE II : Caractérisation <i>ex vivo</i> des variants de LMP1	
	Séquençage nouvelle génération	p.109
МΔ	TERIFIS ET METHODES	n 109
<u>I.</u>	Collecte et extraction des échantillons cliniques	n.109
	1. Echantillons	p.109
	2. Extraction d'ADN	n 110
		p.110
II.	Séquençage nouvelle génération (NGS)	p.111
	1. Préparation de la librairie d'ADN	p.111
	1.1. Nested PCR	p.111
	1.2. Préparation de la librairie d'ADN	p.113
	1.3. Purification et contrôle de la librairie d'ADN	p.113
	2. PCR en émulsion (emPCR)	p.115
	3. Séquençage	p.118
	3.1. Préparation de la plaque de séquençage	p.118
	3.2. Principe du pyroséquençage	p.119
	3.3. Analyse avec le logiciel AVA	p.119
DEC		n 171
I RES	La technique de céquencage GS lunier	p.121
1.	1. Choix du cut off	p.121
	1. Choix du cut-oli 2. Tast de fiebilité et de consibilité	p.121
	2. Test de l'ablitte et de sensibilite	p.121
П.	Résultats de séquençage des échantillons cliniques	p.123
	1. Prévalence de LMP1	p.123
	2. Sensibilité de détection des variants	p.124
	3. Fréquence des variants de LMP1	p.126
	4. Comparaison des compartiments biologiques	p.127
	5. Polymorphisme de LMP1	p.130
	5.1. Souches d'EBV détectées	p.130
	5.2. Mutations ponctuelles	p.132
	Analyza das dannéas slinisuos	n 124
	Analyse des données cliniques	p.134
	5. Analyse des paramètres cliniques en fonction de la presence des variants LIVIP1	p.134
	6. Analyse des parametres cliniques en fonction de la charge virale EBV sanguine ou	m 107
	plasmatique	p.137
DIS	<u>CUSSION</u>	p.139
CO	NCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	p.145
REF	ERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	p.149
AN	NEXES	p.167

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	ADN complementaire
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messager
AVA	Amplicon Variant Analysis
BA	Acide Butyrique
BART	BamHI fragment A Rightward
	Transcript
BCR	B-Cell Receptor
BHRF1	BamHI fragment H Righward open
	reading Frame 1
cHL	Lymphome de Hodgkin Classique
CISIH	Centre d'Information et de Soins de
	l'Immunodéficience Humaine
СМН	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CTAR	C-Terminal Activating Region
EA	Early Antigen
EBER	EBV Encoded RNA
EBNA	EBV Nuclear Antigen
EBV	Virus d'Epstein-Barr
ED-L1	EcoRI D fragment-located LMP1
	promoter
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
emPCR	PCR en émulsion
ERK	Extracellular Regulated Kinase
GFP	Green Fluorescent Protein
HLA	Human Leukocyte Antigen
HRS	Hodgkin et Reed-Sternberg
IC	Intervallle de Confiance
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukine
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based
	activation motif
ΙκΒ	Inibiteur de NF-κB
JNK	c-Jun amino-Terminal Kinase
LCL	Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde
LH	Lymphome de Hodgkin
LMP1	Latent Membrane Protein 1
МАРК	Mitogen-Activated Protein Kinase
miARN	microARN
MID	Multiplex Identifier
MNI	Mononucléose infectieuse
NACos	Nuclear and Adhesion Complex

NC	North Carolina
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
NGS	Séquençage Nouvelle Génération
NHP	Normal Human Plasma
NK	Natural Killer
NLPHL	Lymphome de Hodgkin Nodulaire à
	Prédominance Lymphocytaire
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	Open Reading Frame
ori-Lyt	Origine de réplication Lytique
ori-P	Origine de réplication Plasmidique
pb	paire de base
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFA	Paraformaldéhyde
РІЗК	Phosphatidyl-Inositol 3 Kinase
РТТ	Picotiterplate
RIS	Ratio d'Incidence Standardisé
rpm	rotation par minute
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SLPT	Syndrome Lymphoprolifératif Post-
SLPT	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation
SLPT SVF	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal
SLPT SVF TAP	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen
SLPT SVF TAP	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing
SLPT SVF TAP TE	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA
SLPT SVF TAP TE TEM	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse
SLPT SVF TAP TE TEM TGF	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA TR	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA TR TRADD	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Tumor Necrosis Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TNFR TPA TR TRADD TRAF	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TNFR TPA TR TRADD TRAF TR-L1	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA TRADD TRADD TRAF TR-L1 Ubn	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNFR TNFR TNFR TRADD TRADD TRADD TRAF TR-L1 Ubn VCA	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter Ubinucléine Viral Capsid Antigen
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA TR TRADD TRAF TRAL1 Ubn VCA VEGF	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter Ubinucléine Viral Capsid Antigen
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TNFR TRADD TRAF TRADD TRAF TR-L1 Ubn VCA VEGF VIH	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter Ubinucléine Viral Capsid Antigen Vascular Endothelial Growth Factor
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNFR TNFR TNFR TRADD TRADD TRADD TRAF TR-L1 Ubn VCA VEGF VIH WT	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter Ubinucléine Viral Capsid Antigen Vascular Endothelial Growth Factor Virus de l'Imunodéficience Humaine
SLPT SVF TAP TE TEM TGF TNF TNFR TPA TRADD TRADD TRAF TR-L1 Ubn VCA VEGF VIH WT ZEBRA	Syndrome Lymphoprolifératif Post- Transplantation Sérum de Veau Fœtal Transporter associated with Antigen Processing Tris-EDTA Transition Epithélio Mésenchymateuse Tumor Growth Factor Tumor Necrosis Factor Receptor Tetradecanoylphorbol Acetate Terminal Repeat TNF receptor associated death domain TNF receptor associated factors Terminal Repeat-located LMP1 promoter Ubinucléine Viral Capsid Antigen Vascular Endothelial Growth Factor Virus de l'Imunodéficience Humaine Wild-Type BamHI-Z-encoded EBV Replication

Table des figures

Figure 1 : Particules d'EBV visualisées en microscopie électronique	p.11
Figure 2 : Structure d'une particule virale d'EBV	p.12
Figure 3 : Structure du génome viral d'EBV linéaire et circulaire	p.13
Figure 4 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes	p.15
Figure 5 : Mécanisme d'action des EBNA	p.19
Figure 6 : Structure et fonction de LMP2	p.21
Figure 7 : Cycle réplicatif d'EBV et rôle de la protéine ZEBRA	p.23
Figure 8 : Structure du gène BNLF1	p.33
Figure 9 : Représentation linéaire de la protéine LMP1	p.34
Figure 10 : Comparaison de LMP1 et du TNFR CD40	p.35
Figure 11 : Implication de LMP1 dans la signalisation cellulaire	p.37
Figure 12 : Activation de la voie de signalisation JAK-STAT	p.39
Figure 13 : Les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg dans leur microenvironnement	p.50
Figure 14 : Gènes cibles de NF-κB impliqués dans le développement et la progression des	
cancers	p.56
Figure 15 : Description de la voie de signalisation NF-ĸB et de ses perturbations possibles dans	
les cellules HRS	p.58
Figure 16 : Interaction des cellules HRS avec leur micro-environnement tumoral	p.60
Figure 17 : Double marquage histologique de cellules HRS anti-EBER (brun-noir) et anti-LMP1	
(rouge)	p.63
Figure 18 : Cartographie simplifiée du plasmide p2167	p.77
Figure 19 : Principe de la mutagenèse par PCR chevauchante	p.78
Figure 20 : Description du bacmide maxi-EBV-GFP, p2089	p.80
Figure 21 : Principe de la recombinaison homologue dans le bacmide p2089	p.81
Figure 22 : Expression du CD21 sur les KMH2	p.84
Figure 23 : 293-HEK stablement transfectées par le bacmide maxi-EBV-GFP	p.85
Figure 24 : Contrôle des KMH2-EBV	p.86
Figure 25 : Caractérisation du profil de latence des KMH2-EBV-GFP-LMP1-WT	p.87
Figure 26 : Principe de la salivette	p.110
Figure 27 : Déroulement d'une réaction de séquençage avec le GS Junior	p.111
Figure 28 : Détail des amorces utilisées pour le séquençage GS Junior	p.112

Figure 29 : Exemple de résultat d'une puce Agilent DNA1000	. p.114
Figure 30 : Principe de la PCR en émulsion	. p.115
Figure 31 : Enrichissement des billes portant de l'ADN	. p.116
Figure 32 : Evaluation du nombre de billes purifiées	. p.117
Figure 33 : Remplissage d'une plaque de séquençage (PTT)	. p.118
Figure 34 : Principe du pyroséquençage	. p.119
Figure 35 : Test de fiabilité et de sensibilité du GS Junior	. p.122
Figure 36 : Comparaison des compartiments biologiques - Exemples de patients entrant dans	
les catégories A, B, C, D du tableau 12	. p.127

Table des tableaux

Tableau 1 : Profil d'expression des protéines virales d'EBV selon le type de latence p.17
Tableau 2 : Distribution géographique des génotypes de LMP1 selon la classification d'Edwards p.46
Tableau 3 : Prévalence du variant LMP1-del30 en fonction de la pathologie et de la zone
géographique p.46
Tableau 4 : Epidémiologie du lymphome de Hodgkin en fonction de l'âgep.51
Tableau 5 : Liste des cytokines impliquées dans le développement des lymphomes de Hodgkin p.61
Tableau 6 : Récapitulatif des études portant sur la détection d'EBV chez les patients VIH+
développant un LH p.72
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour les PCR EBV p.83
Tableau 8 : Mix utilisés pour les PCR1 et PCR2 p.112
Tableau 9 : Programmes de thermocycleur utilisés pour les PCR1 et PCR2 p.112
Tableau 10 : Prévalence de LMP1 dans les différentes populations et compartiments biologiquesp.123
Tableau 11 : Tableau récapitulatif de tous les échantillons dans lesquels LMP1 a été
amplifié et séquencé avec les proportions relatives de chaque variant détecté p.125
Tableau 12 : Fréquence des variants de LMP1 dans les différentes populations et compartiments
biologiques p.126
Tableau 13 : Comparaison des compartiments biologiques p.127
Tableau 14 : Comparaison des compartiments biologiques – Détail des patients de la catégorie Cp.129
Tableau 15 : Comparaison des séquences protéiques des souches d'EBV p.130
Tableau 16 : Etude du polymorphisme du codon 322 de LMP1 p.131
Tableau 17 : Mutations ponctuelles identifiées dans la partie C-terminale de LMP1 p.133
Tableau 18 : Caractéristiques cliniques des patients de la cohorte Lymphovir et de la population
contrôle VIH+p.134
Tableau 19 : Facteurs pronostiques de la présence d'un variant LMP1 sauvage ou délété p.136
Tableau 20 : Corrélation entre le taux de CD4 et le variant LMP1-WT dans la cohorte Lymphovir p.136
Tableau 21 : Facteurs pronostiques en fonction de la charge virale EBV dans le sang total p.137
Tableau 22 : Facteurs pronostiques en fonction de la charge virale EBV plasmatique p.138

Table des annexes

Annexe I : Notice d'information et de consentement destinée aux patients séropositifs VIH p.167
Annexe II : Notice d'information et de consentement destinée aux patients atteints d'un
lymphome de Hodgkin et séronégatifs pour le VIH p.168
Annexe III : Liste des MID utilisés pour identifier les échantillons cliniques lors du séquençage p.170
Annexe IV : Totalité des séquences de LMP1 détectées par le séquençage nouvelle génération p.171

INTRODUCTION

Le virus d'Epstein-Barr (EBV)

I. Généralités

1. Découverte du Virus d'Epstein-Barr

Dans les années 60, Michael Anthony Epstein, Bert Achong et Yvonne Barr se sont intéressés au lymphome de Burkitt, tumeur très fréquente chez les enfants en Afrique sub-saharienne et dont la distribution géographique, correspondant à celle du paludisme, suggérait une étiologie impliquant la transmission d'un agent infectieux par un vecteur arthropode. Ils ont découvert par microscopie électronique sur des cultures lymphomateuses issues de lymphomes de Burkitt une particule virale avec les mêmes caractéristiques morphologiques que les herpèsvirus (Figure 1) (Epstein *et al.*, 1965). Des études immunologiques et antigéniques menées par Werner et Gertrude Henlé ont alors mis en évidence qu'il s'agissait d'un nouveau membre de la famille des herpèsvirus, qui fut dès lors nommé virus d'Epstein-Barr (EBV), et que la vaste majorité des individus, dans toute la population mondiale, présentait des anticorps dirigés contre ce virus (Henle *et al.*, 1969). En 1968, un technicien du laboratoire de Gertrude Henlé, séronégatif pour EBV, développa une mononucléose infectieuse (MNI), puis fit une séroconversion EBV. Grâce à cet évènement, l'EBV fut reconnu comme l'agent étiologique de la MNI.



Figure 1 : Particules d'EBV visualisées en microscopie électronique (D'après Epstein et al., 1965) (1) Coupe de lymphoblaste contenant de nombreuses particules immatures d'environ 75nm de diamètre, délimitées par une simple membrane et de profil hexagonal (x76500) (2) Coupe de lymphoblaste contenant des particules immatures (flèche courte) et une particule mature (longue flèche) de 110nm de diamètre, avec une double membrane et un nucléoide dense (x42000) m désigne les mitochondries et s désigne des faisceaux de microtubules (3) Détail d'une particule virale mature de 115nm de diamètre avec une double membrane et un nucléoïde central dense de 45nm (x213500)

Il a été montré que le titre en anticorps anti-EBV était beaucoup plus élevé chez les patients atteints de lymphome de Burkitt que dans la population contrôle. Ces études épidémiologiques ainsi que la démonstration *in vitro* de la capacité du virus à immortaliser les lymphocytes B (Gerper *et al.*, 1969) ont permis de démontrer pour la première fois qu'un virus humain peut être associé à un cancer. Depuis, l'EBV a également été associé à d'autres cancers comme les lymphomes de Hodgkin, les syndromes lymphoprolifératifs post-greffe, les carcinomes du cavum ou gastriques ou bien encore certaines maladies auto-immunes.

2. Structure d'EBV

Le virus d'Epstein-Barr ou HHV-4 (human herpes virus type 4) appartient à la famille des *Herpesviridae*, sous famille des *Gammaherpesvirinae*, genre *Lymphocryptovirus*. Il partage les mêmes caractères structuraux que tous les Herpesviridae : un ADN bicaténaire protégé par une capside icosaédrique, un tégument et une enveloppe externe (Figure 2). La capside d'EBV a pu être produite et purifiée par notre équipe et sa structure tridimensionnelle a été récemment déterminée par cryomicroscopie électronique (Germi *et al.*, 2012).



Figure 2 : Structure d'une particule virale d'EBV

Le génome de l'EBV se compose d'un ADN bicaténaire de 172kb codant pour quelques 86 protéines. L'ADN est linéaire dans la particule virale et porte à ses extrémités deux séquences répétitives (TR : terminal repeat) dont la séquence varie de 4 à 12 répétitions suivant les souches virales. La fusion de ces deux extrémités aboutit à la circularisation du virus, pour donner la forme épisomale sous laquelle le virus persistera lors de sa phase de latence dans les cellules infectées (Rickinson, 2007). Pendant cette période de latence, l'EBV utilise une origine de réplication latente Ori-P pour se répliquer de façon synchrone avec la cellule infectée (Figure 3). Il existe une autre origine de réplication, Ori-Lyt, composée de deux régions homologues DR et DL, servant à la réplication lytique. L'ADN est protégé par une capside icosaédrique. Pour former cette capside, 6 protéines s'arrangent en 12 pentons et 150 hexons, soit 162 capsomères, la protéine majoritaire étant la protéine VCA (viral capsid antigen). La capside est elle-même entourée d'un tégument et d'une enveloppe constituée d'une double couche lipidique, dans laquelle s'insèrent des

glycoprotéines. Parmi ces glycoprotéines, la gp350/220 permet l'adhésion cellulaire grâce à sa liaison au récepteur CR2, appelé également CD21, ce qui correspond à la toute première étape de l'infection virale des lymphocytes B (Szakonyi et al., 2006).



L'EBV a été le premier herpèsvirus dont le génome a été complètement cloné et séquencé, après une digestion du génome viral entier par l'enzyme de restriction BamHI (Baer et al., 1984). La digestion par BamHI permet d'obtenir un ensemble de fragments d'ADN, classés selon leur taille et repérés par une lettre sur la carte de restriction du génome viral (Figure 3b). Deux sens de lecture du génome viral sont possibles et ont été arbitrairement fixés. Le génome linéaire de gauche à droite est le sens R (Rightward), et de droite à gauche est le sens L (Leftward). La plupart des gènes viraux ont été nommés en fonction de leur localisation dans un fragment spécifique et du sens de lecture. Par exemple, le gène BNLF1 codant pour la protéine LMP1 (Latent Membrane Protein 1) signifie séquence N dans la cartographie BamHI (BN), transcrite dans le sens L (de droite à gauche), dans le premier ORF (F1).

la

3. Cycle de vie de l'EBV

Les connaissances actuelles du cycle biologique de l'EBV viennent principalement d'expériences *in vitro* effectuées sur des lignées cellulaires continues. Il peut s'agir de lignées lymphoblastoïdes établies à partir de lymphocytes B humains normaux immortalisés par EBV ou bien de lignées lymphomateuses établies spontanément à partir de lymphocytes B malins issus de lymphomes associés à l'EBV.

3.1. Primo-infection : Attachement et pénétration cellulaire

La première phase de l'infection est caractérisée par une infection lytique dont le siège est le tissu lymphoépithélial de l'oropharynx (Figure 4a). Les lymphocytes B présents dans l'oropharynx sont les cibles préférentielles d'EBV. L'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire des lymphocytes B se fait par une interaction entre la glycoprotéine d'enveloppe virale gp350/220 et le récepteur cellulaire CR2, appelé également CD21. L'entrée d'EBV requiert ensuite la formation d'un complexe entre les quatre glycoprotéines gH, gL, gB et gp42. Ce complexe va permettre à la gp42 d'interagir avec une molécule HLA de classe II et provoquer l'endocytose du virus (Li *et al.,* 1997).

L'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales est un mécanisme plus complexe, non encore complètement résolu. Le taux d'expression de CD21 sur les cellules épithéliales est faible *in vitro*, et n'est pas connu *in vivo*. De même, ces cellules n'expriment pas le HLA de classe II, la présence de la gp42 n'est donc pas nécessaire. L'attachement et l'entrée de la particule virale dans les cellules épithéliales se fait grâce aux glycoprotéines gH et gL sur un récepteur gHgLR (Wang *et al.*, 1998). Une seconde hypothèse est que l'infection des cellules épithéliales peut également avoir lieu par un transfert direct à partir des lymphocytes infectés *via* une synapse virale (Shannon-Lowe *et al.*, 2006). Borza *et al.* (2002) ont mis en évidence le fait que les particules virales produites par les lymphocytes B sont déficientes en gp42 et auront une plus grande capacité à infecter les cellules épithéliales, tandis que les particules virales produites par les cellules épithéliales sont riches en gp42 et auront une plus cellules épithéliales sont riches en gp42 et auront une rès haut niveau d'infectivité pour les lymphocytes B (Borza and Hutt-Fletcher, 2002).

Chez le sujet sain, les cellules épithéliales ne semblent pas être un site où le virus établit une infection latente, mais un site d'amplification de la production virale dans la salive qui peut se maintenir pendant une longue période (Fafi-Kremer et al., 2005a; Hadinoto et al., 2009). Cette première phase de l'infection lytique conduit à une forte production de particules virales excrétées dans la salive du sujet qui est alors très contagieux. Au cours de cette primo-infection, le virus va parallèlement établir une infection latente dans des lymphocytes B naïfs ou des lymphocytes B mémoires conduisant à la multiplication de lymphoblastes exprimant une latence de type III.

(a) Primo-infection



T mémoire

Centre

germinatif



Figure 4 : Cycle de vie du virus d'Epstein-Barr et ses interactions avec les cellules hôtes (d'après Young and Rickinson, 2004) (1) Primo-infection : le virus transmis par la salive infecte un lymphocyte B naïf ou mémoire du tissu lymphoépithélial oropharyngé soit directement, soit après passage à travers une cellule épithéliale (transcytose). Le virus établit une infection latente dans le lymphocyte B qui se transforme en lymphoblaste proliférant (latence III). La prolifération de ces cellules est contrôlée par la réponse immunitaire des lymphocytes T CD8+, seuls quelques lymphoblastes échappent à la réponse immunitaire et vont constituer un réservoir de cellules B mémoires dans lesquelles l'expression d'antigènes viraux est réduite au minimum (latence 0), sauf lors d'une division cellulaire physiologique (latence I). Cela constitue le site de persistance du virus EBV. (2) Persistance de l'infection : lors d'une stimulation antigénique, une cellule B mémoire se différencie en plasmocyte, provoquant la réactivation du virus et l'initiation du cycle lytique. Les virions produits peuvent infecter des lymphocytes B naïfs ou mémoires ou les cellules épithéliales de l'oropharynx, où l'infection lytique est entretenue et amplifiée avec excrétion de virus dans la salive. La réponse immune de l'hôte (en particulier les lymphocytes T CD8+), permet de contrôler l'infection à presque tous les stades hormis lors de la phase de latence 0.

Lymphocyte

B mémoire

Plasmocyte

La prolifération de ces cellules est contrôlée par une forte réponse immune menée par les lymphocytes T CD8+. Seules quelques cellules survivent en réduisant au minimum l'expression d'antigènes viraux de latence, constituant ainsi un réservoir de cellules B mémoires, de latence 0/I en fonction de l'absence ou de la présence d'expression d'EBNA-1. Ainsi, l'EBV persiste à vie dans quelques lymphocytes B mémoires (un sur un million) chez le sujet immunocompétent (Figure 4b) (Thorley-Lawson, 2005).

Le réservoir de lymphocytes B mémoires infectés par EBV est soumis au même contrôle que tous les autres lymphocytes mémoires concernant la migration et la différenciation. Occasionnellement, des cellules infectées par l'EBV sont recrutées au niveau des centres germinaux, activant différents programmes de latence, après lesquels les cellules retournent simplement dans le réservoir de lymphocytes B mémoires, ou bien se différencient en plasmocytes, retournent sur les sites de l'oropharynx et activent le cycle lytique viral (Figure 4b). Les virions produits peuvent à leur tour induire le cycle lytique dans les cellules épithéliales, l'individu sera alors contagieux quelques jours, voire quelques semaines. Les plasmocytes activés seront finalement contrôlés par les lymphocytes T CD8+ ou augmenteront le réservoir de lymphocytes B mémoires.

3.2. Latence virale et protéines de latence

A l'état latent, le génome de l'EBV est maintenu sous forme épisomale dans la cellule hôte et n'exprime qu'un nombre de gènes limité. Chaque copie de l'épisome est répliquée par une ADN polymérase cellulaire lors du cycle cellulaire, à partir de l'origine de réplication Ori-P. Plusieurs types de latence peuvent être observés *in vitro*, associés à différentes pathologies *in vivo*. Les latences de type I, II et III sont définies en fonction du nombre de protéines virales exprimées (Tableau 1).

Le modèle le plus couramment utilisé *in vitro* pour étudier la latence sont les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCL), issues de l'infection de lymphocytes B humains sains par l'EBV. Ces cellules montrent un profil de latence de type III, c'est-à-dire que tous les gènes de latence sont exprimés, soit 6 antigènes nucléaires : EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP et 3 protéines de latence membranaires LMP1, LMP2a et LMP2b. Les LCL montrent également une expression abondante de petits ARN non-polyadenylés, les EBER1 et EBER2. Leur fonction n'est pas clairement décrite mais ils sont exprimés dans toutes les formes de latence. Dans les lignées lymphomateuses, l'expression des gènes de latence est variable mais plus restreinte. Il s'agit d'une latence de type I quand seuls EBNA-1 et les EBERs sont exprimés, et de latence de type II quand il y a expression de EBNA-1, LMP1, LMP2 et les EBERs. Il existe également une latence de type 0, encore

appelée « latence vraie », lors de laquelle les EBERs seuls sont exprimés. C'est le cas des lymphocytes B mémoires qui ne sont pas ciblés par le système immunitaire et constituent ainsi le site de persistance du virus (Young and Murray, 2003; Young and Rickinson, 2004).

In vivo, EBV est associé avec différents cancers, exprimant chacun un profil de protéines virales de latence différentes (Tableau 1). *In vitro*, l'infection par EBV de lymphocytes B naïfs permet d'établir des lignées B immortalisées (Gerper *et al.*, 1969). L'étude d'EBV a permis de mettre en évidence que les protéines exprimées lors de la latence virale sont les mêmes protéines nécessaires à la transformation des cellules infectées. L'expression inappropriée de protéines virales de latence impliquées dans la persistance virale peut contribuer à la pathogenèse des cancers associés à l'EBV.

	Latence de type 0	Latence de Type I	Latence de type II	Latence de Type III
EBNA1	-	+	+	+
EBNA2	-	-	-	+
EBNA3A,B,C	-	-	-	+
EBNALP	-	-	-	+
LMP1	-	-	+	+
LMP2A,B	-	-	+	+
EBER	+	+	+	+
BART	;	+	+	+
<u>Exemples</u>	Lymphocytes B mémoires	Lymphome de Burkitt	Lymphome de Hodgkin, Carcinome du nasopharynx	lignées cellulaires lymphoblastoides, Lymphomes associés au VIH, lymphoproliférations post-transplantation

Tableau 1 : Profil d'expression des protéines virales d'EBV selon le type de latence

3.2.1. Antigènes nucléaires (EBNA, Epstein-Barr virus Nuclear Antigens)

Les EBNA sont des protéines nucléaires ayant une action sur des facteurs de transcription aussi bien viraux que cellulaires.

- **EBNA1** est exprimée dans toutes les cellules infectées, dans tous les types de latence. Elle est nécessaire à la réplication et au maintien du génome de l'EBV sous forme épisomale. La réplication « latente » d'EBV, par opposition à la réplication « lytique », fait intervenir l'origine de réplication Ori-P. La liaison d'EBNA1 sur la séquence FR (family repeat) d'Ori-P permet d'ancrer l'ADN viral à l'ADN de la cellule hôte. EBNA1 se fixe également sur l'élément DS d'Ori-P pour permettre la réplication simultanée de l'ADN viral et cellulaire et s'assurer que le génome viral sera transmis aux deux cellules filles lors de la division cellulaire (Hammerschmidt and Sugden, 2013).

Etant donné qu'EBNA1 est exprimé dans les cellules infectées par EBV, mais que la grande majorité des ces cellules ne se transforme pas en cellule cancéreuse, le rôle d'EBNA1 dans l'oncogénicité associée à EBV a été peu étudié. Cependant, EBNA1 pourrait contribuer à la pathogenèse du lymphome de Hodgkin en augmentant l'expression de CCL20, ce qui attire les lymphocytes T régulateurs et prévient les réponses immunitaires contre la population tumorale infectéee par EBV (Baumforth *et al.*, 2008). EBNA1 provoque également une diminution du niveau d'expression de la protéine Smad2, interrompant ainsi la voie de signalisation du TGF-β. Cela a pour conséquence de diminuer l'expression du gène suppresseur de tumeur PTPRK (protein tyrosine phosphatase receptor κ) (Flavell *et al.*, 2008).

- **EBNA2** est la première protéine virale exprimée après infection de lymphocytes B *in vitro*. Elle est essentielle à l'immortalisation des lymphocytes *in vitro*, car l'EBV délété d'EBNA2 n'est plus capable d'immortaliser les lymphocytes B (Cohen and Kieff, 1991). Elle interagit avec des protéines qui reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques (tel que RBP-Jκ) et active ainsi la transcription aussi bien de gènes cellulaires comme CD21 et CD23 ou que de gènes viraux tels que LMP1 et LMP2 (Calender *et al.,* 1990) (Figure 5). EBNA2 semble également interagir avec l'oncogène *c-myc* afin de favoriser la prolifération des lymphocytes B (Kaiser *et al.,* 1999).

- EBNA3 A, B et C sont des régulateurs de la transcription. Ces trois protéines nucléaires sont hydrophiles, ont une extrémité N-terminale commune mais diffèrent par leur extrémité C-terminale. EBNA3A et EBNA3C sont particulièrement importantes pour la transformation des lymphocytes B *in vitro*, tandis qu'EBNA3B ne l'est pas. Toutes les trois interfèrent avec EBNA2 en empêchant son interaction avec la protéine RBP-Jĸ, protéine qui se lie à l'ADN, et donc suppriment l'activité transactivationnelle d'EBNA2 (Figure 5) (Young and Rickinson, 2004). EBNA3C coopère avec le protooncogène Ras pour immortaliser et transformer les fibroblastes de rongeurs (Parker *et al.,* 1996). Elle peut interagir avec la protéine suppressive de tumeur Rb afin de l'inactiver et favoriser la progression tumorale (Knight, Sharma, and Robertson, 2005). EBNA3C promeut la prolifération cellulaire des lymphocytes T cytotoxiques par l'intermédiaire de la cycline D1, favorisant la transition entre les phases G1 à S du cycle cellulaire (Saha *et al.,* 2011). EBNA3C et coopère avec EBNA2 et EBNA3A pour moduler l'expression des gènes cellulaires dans les lymphocytes infectés par EBV.

- **EBNA-LP** est requise pour la survie et la croissance des lymphocytes après la transformation *in vitro (Mannick et al., 1991)*. Elle interagit avec EBNA2 afin de favoriser son rôle activateur de la transcription. Ensemble, elles activent notamment le promoteur de LMP1 (Harada and Kieff, 1997).



Figure 5 : Mécanisme d'action des EBNA. (d'après Young and Rickinson, 2004) (1) EBNA2 fonctionne comme un activateur transcriptionnel en interagissant avec la protéine RBP-JK et en levant sa répression par le complexe multiprotéique composé, entre autre, de SMRT, SIN3A et SKIP. (2) EBNA2 recrute la machinerie transcriptionnelle et permet la transcription de nombreux gènes cellulaires et viraux. Les protéines EBNA3 modulent l'activité transcriptionnelle d'EBNA2 en régulant sa liaison avec RBP-JK.

3.2.2. Protéines de latence membranaires (LMP, Latent Membrane Proteins)

- LMP1 est la principale protéine oncogène d'EBV. LMP1 est capable de transformer plusieurs types cellulaires, les lymphocytes B, les cellules épithéliales mais également les fibroblastes de rongeurs (Wang *et al.*, 1985). Quand LMP1 est délétée du génome d'EBV, le virus perd sa capacité à immortaliser les lymphocytes B *in vitro*, elle joue donc un rôle essentiel dans l'immortalisation (Rickinson, 2007). LMP1 est fréquemment détectée dans plusieurs cancers associés à EBV, incluant les lymphomes post-transplantation, les carcinomes du cavum ou les lymphomes de Hodgkin. LMP1 fonctionne comme un récepteur au TNF- α (TNFR) constitutivement actif. Elle interagit par son extrémité C-terminale cytosolique avec de nombreux facteurs associés au TNFR (TRAFs) et induit plusieurs cascades de signalisation, aboutissant à l'expression de cytokines et de protéines anti-apoptotiques, dans le but de favoriser la survie et la croissance cellulaire. Tout cela sera repris et détaillé dans le chapitre consacré à la protéine LMP1.

- LMP2A et LMP2B ne sont pas nécessaires à la transformation des lymphocytes B *in vitro* mais jouent un rôle dans la prolifération et la survie cellulaire. LMP2A est capable d'induire l'expression de gènes impliqués dans l'induction du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et le métabolisme des ARN et ADN. Elle diminue par ailleurs l'expression de facteurs caractéristiques des lymphocytes B. Plusieurs des altérations dans l'expression des gènes causées par LMP2a sont similaires à ce qui est décrit dans les cellules tumorales du lymphome de Hodgkin, les cellules de Reed-Sternberg. Cela suggère que l'expression de LMP2a dans les lymphocytes B infectés par EBV pourrait conduire à l'induction et la maintenance d'un état prolifératif susceptible, à long terme, d'aboutir au développement d'un lymphome de Hodgkin (Portis *et al.*, 2003).

LMP2 possède dans sa partie cytosolique un motif ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) identique à celui des co-recepteurs du BCR. Le motif ITAM permet de transmettre le signal d'activation après stimulation du récepteur des cellules B (BCR). LMP2A lie et séquestre les tyrosines kinases du BCR, et inhibe ainsi sa signalisation. Cela prévient l'activation des lymphocytes B infectés par EBV, induite par les antigènes, et qui causerait l'entrée du virus en cycle lytique (Merchant *et al.,* 2001).

Cependant, LMP2A est également capable de stimuler ces mêmes tyrosines kinases afin de mimer le BCR. Dans un modèle de souris transgéniques, l'expression de LMP2A permet la survie de lymphocytes B déficients en BCR. LMP2A remplace donc les signaux de survie transmis en temps normal par le BCR (Caldwell *et al.*, 1998) (Figure 6).

20



Figure 6 : Structure et fonction de LMP2. (d'après Young and Rickinson, 2004) Les structures de LMP2a et LMP2b sont similaires, toutes deux possèdent 12 domaines transmembranaires et une queue cytosolique C-terminale de 27 acides aminés. LMP2a possède en plus un long domaine N-terminal cytosolique de 119 acides aminés comportant 8 résidus tyrosine, dont deux forment le motif ITAM (Tyr74 et Tyr85). Le motif ITAM recrute des tyrosines kinases de la famille SRC et SYK, les régulant négativement. Le résidu Tyr 112 lie la protéine kinase, LYN, et permet la phosphorylation constitutive des autres résidus tyrosine de LMP2a. Un motif phosphotyrosine (PY) de LMP2a recrute également la ligase NEDD4, qui favorise l'ubiquitylation de LMP2a et de ses protéines associées et provoque ainsi leur dégradation. LMP2a intervient dans les voies de signalisation des MAPkinases et PI3kinases afin d'activer le facteur de transcription Jun et participer à la survie et à la mobilité cellulaire.

3.2.3. ARN viraux

- Les **EBERs** (EBV-Encoded small non polyadenylated RNAs) sont de petits ARN non codants exprimés dans tous les types de latence. Le haut niveau de conservation de séquence des EBER suggère qu'ils sont importants pour le cycle de vie d'EBV, cependant les études avec des mutants d'EBV délétés en EBER indiquent qu'ils ne jouent pas de rôle crucial dans l'infection et la réplication virale *in vitro* (Takada, 2012). Yajima *et al.* (2005) ont montré qu'un virus dépourvu des EBERs est capable d'infecter un lymphocyte B, mais le pouvoir transformant du virus est réduit de 100 fois (Yajima *et al.*, 2005). Dans des modèles cellulaires de lymphome de Burkitt, les EBERs augmentent la tumorigénicité et la survie cellulaire en induisant l'expression d'IL-10 (Samanta *et al.*, 2008). Cela suggère que les EBERs ont un rôle dans la pathogenèse des maladies associées à l'EBV et dans la persistance virale.

- Les **microARN** (miARN): A partir d'une lignée cellulaire issue d'un lymphome de Burkitt et infectée par l'EBV, Pfeffer *et al.* ont été les premiers à mettre en évidence que les virus expriment également des microARN (Pfeffer *et al.,* 2004). Ces miARN viraux sont issus de deux régions principales du génome d'EBV. La première est située à proximité du gène BHRF1 (BamHI fragment H rightward open

reading frame 1) et la deuxième est localisée dans la région BART (BamHI fragment A rightward transcript), donnant ainsi leur nom aux miARN. Les BARTs sont des petits ARN épissés de manière alternative, pour lesquels aucune protéine n'a pu être identifiée. Leur détection systématique dans les lymphocytes B infectés, aussi bien sains qu'associés à des tumeurs, suggère qu'ils auraient un rôle dans la persistance virale (Forte and Luftig, 2011). Un mutant des 3 miARN BHRF1 a une capacité de transformation des lymphocytes B réduite de plus de 20 fois et les lymphocytes B infectés avec ce variant d'EBV ont une croissance très ralentie, avec deux fois moins de cellules entrant en phase S du cycle cellulaire. Cela confirme que, si les miARN ne sont pas nécessaires à la transformation, ils favorisent la persistance du virus dans les cellules infectées (Feederle et al., 2011). D'autres études se sont intéressées à montrer que les miARN peuvent servir de biomarqueurs dans certaines pathologies associées à l'EBV. Par exemple, le miARN BART17 est significativement plus abondant dans le plasma de patients ayant un carcinome du cavum comparé à une population contrôle (Gourzones et al., 2013). De la même manière, certains miARNs, comme BART1-5p, 2-5p, 5, et 22, sont plus fortement retrouvés dans le plasma de patients ayant une infection chronique à EBV comparé aux patients ayant une MNI ou des porteurs sains. De plus, de forts taux plasmatiques de BART2-5p et BART22 ont pu être associés à la présence de symptômes systémiques, c'est-à-dire à une plus grande sévérité de la maladie (Kawano et al., 2013).

3.3. La réplication virale – les protéines du cycle productif

Bien que la plupart des cellules B soient infectées de manière latente par l'EBV, celui-ci peut se réactiver périodiquement et initier un cycle productif ou cycle lytique. Le cycle lytique correspond à la phase de réplication du virus lors de laquelle les machineries enzymatiques virale et cellulaire sont exploitées pour exprimer les protéines du cycle lytique, répliquer le génome viral et produire de nouveaux virions infectieux. Ceci conduit généralement à la mort de la cellule hôte, d'où la qualification de cycle lytique.

In vivo, l'activation des lymphocytes B par des antigènes viraux pourrait être un stimulus physiologique conduisant à la réactivation du cycle lytique de l'EBV. *In vitro*, il existe différents moyens d'induire le cycle lytique à partir de cellules infectées par l'EBV de manière latente. Il peut être obtenu par stimulation chimique par des esters de phorbol (TPA) et/ou l'acide butyrique (BA), ou par surexpression dans les cellules latentes du facteur de transcription ZEBRA, ou bien encore par stimulation des récepteurs des lymphocytes B (BCR) par des immunoglobulines. Le TGF-β est également capable d'induire le cycle lytique *in vitro* dans des lignées cellulaires de lymphome de

Burkitt, par un mécanisme dépendant de la protéine kinase ERK (Fahmi *et al.,* 2000). Quel que soit le stimulus, un signal nucléaire est déclenché à partir d'un ou plusieurs mécanismes et aboutit à l'activation des deux promoteurs viraux Zp et Rp des gènes BZLF1 et BRLF1 (Israel, 2005).

La réactivation du cycle lytique de l'EBV à partir de cellules infectées de manière latente est un processus séquentiel très précisément régulé. Cela commence par l'expression de gènes très précoces qui activent l'expression de gènes précoces nécessaires à la réplication du génome viral, pour finir avec l'expression de gènes tardifs essentiellement structuraux (Figure 7).



Figure 7 : Cycle réplicatif d'EBV et rôle de la protéine ZEBRA. L'activation des lymphocytes B latents par un stimulus physiologique ou chimique provoque la réactivation du cycle réplicatif d'EBV. L'expression des facteurs de transcription très précoces ZEBRA et Rta permet l'expression des protéines précoces, nécessaires à la réplication du génome viral, pour finir avec l'expression des protéines tardives essentiellement structurales. Un cycle productif aboutit à la formation et à la libération dans le milieu extérieur de particules virales infectieuses. Le facteur de transcription ZEBRA est capable d'interagir avec les protéines et les gènes de la cellule infectée, il est donc un des facteurs impliqués dans la pathogénie des cancers associés à l'EBV.

LES PROTEINES DU CYCLE PRODUCTIF :

- Les protéines très précoces (IEA, Immediate Early Antigen) :

Les gènes BZLF1 et BRLF1 codent pour les protéines ZEBRA (*Bam*HI fragment **Z** Epstein-Barr Replication Activator, autrement appelé Z, Zta ou EB1) et Rta (ou R). Ce sont des facteurs de transcription déclenchant toute la cascade d'expression des gènes du cycle lytique en transactivant les promoteurs des gènes précoces ainsi que leurs propres promoteurs.

ZEBRA est la première protéine virale exprimée lors de la réactivation du cycle lytique d'EBV. Elle appartient à la famille des transactivateurs bZIP (basique/leucine Zipper), avec les facteurs cellulaires c-jun et c-Fos. C'est une protéine homodimérique de 245 acides aminés qui possède un site de dimérisation, un site de fixation à l'ADN reconnaissant des séquences ZRE (Z-Responsive Elements) et un site transactivateur. La structure de la partie C-terminale de ZEBRA (résidus 175-245) en complexe avec l'ADN a pu être résolue en 2006 dans notre laboratoire. Cette étude a permis de mieux caractériser les domaines fonctionnels impliqués dans la dimérisation et la fixation à l'ADN de la protéine (Petosa *et al.,* 2006).

L'expression du gène BZLF1, peut être régulée de manière positive ou négative par la fixation de facteurs cellulaires sur les séquences régulatrices de son promoteur Zp, tel que C/EBPα ou MEF2-D. ZEBRA elle-même est capable de se fixer sur les sites ZRE de son promoteur et d'activer sa propre expression. De plus, des modifications post-traductionnelles de ZEBRA peuvent activer (phosphorylation) ou inhiber (oxydation, S-nitrosylation, sumoylation) ses fonctions. Par exemple la production d'oxyde nitrique dans des lignées lymphoblastoïdes a été associée à une inhibition de la réactivation virale (Mannick *et al.,* 1994).

En général, la méthylation des promoteurs cellulaires réprime leur transcription et contribue à leur mise sous silence épigénétique. Lors de l'infection des lymphocytes B par EBV, on observe une méthylation progressive des promoteurs viraux. La majorité des gènes est alors réprimée et la synthèse de nouveaux virions est inhibée. Cependant, une particularité de ZEBRA est sa capacité à se fixer préférentiellement sur les promoteurs de gènes méthylés (Bhende *et al.,* 2004). Ce mécanisme a certainement été mis en place par l'EBV pour surmonter la répression des gènes viraux et permettre la réplication virale (Woellmer and Hammerschmidt, 2013).

Par ailleurs, des interactions entre des protéines cellulaires et ZEBRA permettent d'interférer avec la réactivation virale de l'EBV. La protéine CBP et le facteur oncogène c-myb coopèrent avec ZEBRA et potentialisent ses fonctions activatrices sur le cycle lytique (Kenney *et al.,* 1992; Zerby *et al.,* 1999). D'autres protéines, en revanche, sont responsables d'une inhibition de ZEBRA, comme les récepteurs de l'acide rétinoïque qui se lient à ZEBRA au niveau de son site de dimérisation et l'empêchent ainsi de se lier à l'ADN (Sista et al., 1995). L'équipe lyonnaise d'Alain Sergeant, en collaboration avec une équipe américaine, a décrit en 2000 un nouveau partenaire cellulaire de ZEBRA, l'Ubinucléine (Ubn), capable d'interagir avec ZEBRA et l'empêchant de se fixer sur ses séquences d'ADN cibles (Aho et al., 2000). Nous avons montré ensemble par la suite que l'Ubn appartient à la famille des protéines NACos (Nuclear and Adhesion Complex) ayant une double localisation cellulaire, au niveau du noyau et des jonctions serrées de la membrane plasmique (Aho et al., 2009). L'Ubn pourrait avoir un rôle de modulateur du cycle productif d'EBV. Exprimée dans le noyau de cellules épithéliales indifférenciées, elle interagit avec ZEBRA et diminue la formation de particules virales infectieuses. Tandis que dans les cellules épithéliales différenciées, elle est séquestrée au niveau des jonctions serrées et laisse ZEBRA libre d'initier le cycle productif (Gruffat et al., 2011). En nous intéressant aux autres partenaires cellulaires de l'Ubn, nous avons précisé que la régulation de la localisation cellulaire de l'Ubn fait certainement intervenir une interaction avec la protéine 14-3-3ε, impliquée dans le transport nucléocytoplasmique de nombreux ligands, et que cette interaction est conditionnée par la phosphorylation de l'Ubn par une protéine kinase A (Conti et al., 2013; Lupo et al., 2012).

La protéine ZEBRA, à elle seule, a la capacité d'interférer avec l'homéostasie cellulaire en interagissant directement avec des protéines cellulaires ou en régulant l'expression de gènes cellulaires. Elle interagit avec différentes protéines pour arrêter le cycle cellulaire, phénomène qui serait favorable à la réplication virale, au détriment de la réplication de l'ADN cellulaire (Israel, 2005). Par ailleurs, des études montrent que ZEBRA régulerait la production de certaines cytokines ; par exemple, en augmentant la sécrétion des cytokines immunosuppressives comme le TGF-β et l'IL-10. ZEBRA est également impliquée dans l'inhibition de l'expression des molécules de présentation de l'antigène du CMH de classe I et II. Ce facteur de transcription viral a donc un rôle immunomodulateur qui participe vraisemblablement à créer un microenvironnement favorable à la survie des cellules infectées par l'EBV et à échapper au système immunitaire (Chen *et al.*, 2009).

La capacité de ZEBRA à traverser les membranes cellulaires a été exploitée de manière originale par une équipe de recherche grenobloise, qui a identifié le domaine minimum de ZEBRA nécessaire à l'internalisation. Ce domaine minimum, correspondant aux acides aminés 170-220, a été fusionné à différentes protéines comme la GFP. Leurs travaux montrent une internalisation efficace de ces constructions dans différentes lignées cellulaires, par translocation directe à travers la double couche lipidique de la membrane. Ce mécanisme d'internalisation aidée par le domaine minimum de ZEBRA a une application potentielle en thérapeutique, en permettant une délivrance efficace dans les cellules de protéines biologiquement actives (Rothe *et al.,* 2010).

25

- Les protéines précoces (EA, Early Antigen) :

Les protéines précoces sont impliquées dans la réplication de l'ADN viral et dans la régulation de l'expression des protéines tardives. Parmi les protéines formant le complexe de réplication, on distingue l'ADN polymérase BALF5, la protéine de liaison à l'ADN BALF2, le complexe hélicaseprimase BBLF4–BSLF1, le facteur de processivité BMRF1 ou encore l'exonucléase alcaline BGLF5. On trouve également des protéines associées au complexe de réplication qui sont importantes pour le métabolisme des acides nucléiques, comme la déoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (dUTPase) BLLF3, la thymidine kinase BXLF1 ou la ribonucléotide réductase BaRF1.

Parmi les protéines précoces participant à la régulation de l'expression des protéines tardives, la protéine EB2 (ou BMLF1) est capable de se fixer sur des ARNm viraux ou cellulaires afin de les stabiliser, permettre leur export nucléaire ainsi que leur traduction (Juillard et al., 2012 ; Juillard et al., 2009). La protéine BcRF1 active la transcription des gènes viraux tardifs en se fixant sur un motif TATT de leur promoteur, elle est nécessaire à la production de particules virales infectieuses (Gruffat *et al.,* 2012).

- Les protéines tardives :

Les protéines tardives sont exprimées après la réplication du génome, ce sont des protéines de structure impliquées dans la formation de la particule virale. Elles comprennent des antigènes de capside tels que VCA, (viral capsid antigen, BcLF1) et des antigènes de membrane comme les glycoprotéines gp110 (BALF4), gp 350/220 (BLLF1) ou gp42 (BDLF3). On trouve également la protéase (BVRF2) nécessaire à l'assemblage et à la maturation des particules virales.

Lors de la fin de la phase lytique du cycle viral, l'EBV exprime également le gène *BCRF1* codant pour une protéine homologue à 84% à l'IL-10 humaine, appelée IL-10 virale ou vIL-10 (Hsu *et al.*, 1990). Cette protéine est nécessaire à la transformation des cellules B par EBV (Miyazaki, Cheung, and Dosch, 1993). De plus, en inhibant l'expression des molécules du CMH de classe II, l'IL-10 virale diminue la capacité de présentation des antigènes par les monocytes, diminuant ainsi l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4+ (de Waal Malefyt *et al.*, 1991).

II. Pathologies associées à l'EBV

L'EBV est un virus ubiquitaire présent chez environ 95% de la population humaine adulte. La transmission du virus se fait principalement par la salive, mais il peut également se transmettre par le sang. La primo-infection est souvent asymptomatique mais peut entraîner chez l'adolescent ou le jeune adulte une mononucléose infectieuse. Le virus persiste ensuite dans l'organisme toute la vie à l'état latent dans les lymphocytes B mémoires et peut se réactiver de manière intermittente et initier un cycle lytique qui aboutit à la production de nouvelles particules virales capables d'infecter aussi un autre type cellulaire, les cellules épithéliales de l'oropharynx. La multiplication de l'EBV au niveau de la sphère oropharyngée entraîne le relargage de virions dans la salive permettant ainsi la transmission interhumaine du virus. Pendant toutes les phases du cycle biologique de l'EBV, la pression immunitaire de l'hôte assure le contrôle de l'infection (Chijioke *et al.*, 2013; Rickinson, 2007). Par ailleurs, l'EBV possède la propriété d'induire *in vitro* l'immortalisation des cellules B infectées et a été associé, *in vivo*, à la pathogénie de plusieurs cancers développés aux dépens des lymphocytes B comme le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin ou les lymphoproliférations post-transplantation, ou des cellules épithéliales comme le carcinome indifférencié du cavum ou encore le carcinome gastrique.

1. Mononucléose infectieuse

La primo-infection à EBV survient très souvent dans la petite enfance. Les enfants de moins de 5 ans montrent une sérologie positive à l'EBV dans 50% des cas dans les pays occidentaux, et dans 100% des cas dans les pays en voie de développement. A cet âge, l'infection par l'EBV est généralement asymptomatique ou peut se révéler sous la forme d'une pharyngite discrète. Lorsque la primo-infection survient plus tard, lors de l'adolescence ou chez les jeunes adultes, elle est symptomatique dans environ 50% des cas et se manifeste par une mononucléose infectieuse (MNI). Après une incubation de 4 à 6 semaines, la MNI se caractérise par de la fièvre, des adénopathies aigues et une angine, accompagnées souvent d'une asthénie importante. Le bilan sanguin montre une hyperleucocytose et la présence de lymphocytes T CD8+ atypiques de grande taille. Dans 10% des cas, les patients développeront une splénomégalie ou une hépatomégalie, et de manière exceptionnelle des complications pourront apparaître, telles qu'une anémie hémolytique, une myocardite ou des complications neurologiques. Toutes ces manifestations cliniques ne sont pas dûes à l'infection par le virus elle-même, mais sont le produit d'une réaction immunitaire exagérée causant une lymphoprolifération des cellules T CD8+ contre les antigènes viraux (Hislop et al., 2007). Les symptômes régressent habituellement en quelques semaines, sauf l'asthénie qui peut persister plusieurs mois à une année.

2. Lymphomes associés à l'EBV

L'EBV est associé à environ 1% des tumeurs mondiales avec une prévalence de 15 à 100% en fonction du cancer et de la localisation géographique. A tel point que la détection d'EBV dans certains cancers est devenue une analyse de routine et est pour le médecin clinicien une aide au diagnostic, au pronostic et peut orienter la thérapeutique (Delecluse *et al.*, 2007).

2.1. Lymphoproliférations induites par l'immunosuppression

2.1.1 Syndrome lymphoprolifératif post-transplantation

Le syndrome lymphoprolifératif post-transplantation (SLPT) regroupe toutes les lymphoproliférations survenant après une greffe. En effet, après une greffe d'organe un traitement immunosuppresseur est administré au receveur pour prévenir d'un rejet du greffon. Les patients greffés de moelle osseuse sont conditionnés avant la greffe avec de fortes doses de radiothérapie et/ou de chimiothérapie et reçoivent après la greffe un traitement immunosuppresseur chargé de prévenir de la réaction du greffon contre l'hôte. Tous ces traitements provoquent un déficit en lymphocytes T et les patients ont alors un risque élevé de développer des lymphomes des cellules B. La plupart des SLPT se déclarent l'année suivant la greffe, lorsque l'immunosuppression thérapeutique est la plus importante. Leur incidence et leur présentation clinique varie en fonction de l'organe transplanté, de la durée de l'immunosuppression, du dosage et du nombre d'immunosuppresseurs utilisés. Leur gravité peut aller de la simple prolifération polyclonale de lymphocytes B, qui régresse habituellement à la levée de l'immunosuppression, jusqu'au lymphome non-hodgkinien monoclonal et agressif, qui ne se résout pas à la levée de l'immunosuppression. La majorité des SLPT est EBV positive (80% des cas) et montre une latence de type III, bien que des profils de latence de type I et II puissent également être trouvés (Wistinghausen et al., 2013; Young and Murray, 2003; Young and Rickinson, 2004).

Des lymphoproliférations semblables sont observées chez des patients avec certaines formes d'immunodéficience héritée comme le syndrome de lymphoprolifération lié à l'X ou chez des patients traités par des immunosuppresseurs pour une maladie auto-immune. Dans ce dernier cas, les syndromes lymphoprolifératifs sont associés à l'EBV dans 50% des cas (Tran *et al.,* 2008).

Quelques cas de SLPT non associés à l'EBV ont été décrits, qui surviendraient plus tardivement après la greffe et auraient un plus mauvais pronostic que les SLPT associés à EBV.

2.1.2. Lymphomes des patients VIH-séropositifs

Depuis une vingtaine d'années, la disponibilité des multithérapies antirétrovirales a aidé à restaurer l'immunité des personnes VIH-séropositives et a clairement permis de diminuer le taux de mortalité dû au SIDA. On a pu observer également une diminution des pathologies associées au SIDA, avec une diminution globale du nombre de lymphomes, notamment le sarcome de Kaposi, les lymphomes non-hodgkiniens et les lymphomes cérébraux (Besson *et al.*, 2001). Néanmoins, les cancers associés au VIH restent une importante cause de décès.

Les patients porteurs du VIH sont particulièrement susceptibles de développer des pathologies associées à l'EBV. En effet, au cours de l'évolution de leur maladie, ces patients pourront présenter différents types de lymphomes, associés à EBV dans 30 à 100 % des cas selon le lymphome. Chez les patients VIH-séropositifs, l'association à l'EBV est de 50-70% pour les lymphomes non-Hodgkiniens et de seulement 30-40% dans le cas des lymphomes de Burkitt. Le pourcentage d'association de l'EBV aux lymphomes de patients VIH-séropositifs monte jusqu'à 80-100% dans les cas de lymphome de Hodgkin et 90-100% pour les lymphomes immunoblastiques et cérébraux primitifs. Les trois types de latence d'EBV ont été décrits dans les différentes manifestations lymphoprolifératives associées au VIH (Young and Murray, 2003).

2.2. Lymphomes des sujets immunocompétants

2.2.1. Lymphome de Burkitt

En Afrique sub-saharienne, le lymphome de Burkitt est endémique avec une incidence annuelle de 5 à 10 cas pour 100 000 enfants. Dans plus de 90% des cas, on le trouve associé à l'EBV. Dans le reste du monde, les cas sont sporadiques et sont associés à l'EBV dans seulement 15% des cas. Le lymphome de Burkitt résulte d'une prolifération intense de cellules lymphoïdes B. Le facteur principal de la pathogenèse du lymphome de Burkitt est une translocation chromosomique impliquant le bras long du chromosome 8 (8q24), dans la région du proto-oncogène *c-myc*. Cette translocation conduit à la dérégulation de l'expression de l'oncogène *c-myc* favorisant l'apparition de cellules cancéreuses. Le rôle d'EBV n'est pas clairement élucidé, mais l'expression des gènes de latence de type I, EBNA1 et les EBERs, pourrait avoir un rôle dans la sélection et la prolifération des cellules malignes (Young and Murray, 2003). Récemment, il a été mis en évidence que les lymphomes de Burkitt EBV-positifs ont un profil d'expression de miARN cellulaires particulier. Notamment, EBNA1 induit l'expression du hsa-miR-127, compromettant la différenciation des cellules B infectées par EBV en cellules mémoires (De Falco *et al.*, 2009, Onnis *et al.*, 2012).

On constate une corrélation entre la répartition des lymphomes de Burkitt endémiques et celle du paludisme qui est reconnu comme étant avec EBV un cofacteur des lymphomes de Burkitt.

29

Certaines protéines de l'agent du paludisme, *P. falciparum*, tel qu'un domaine riche en cystéine de l'antigène membranaire (CIDR1α), sont impliquées dans l'activation de lymphocytes B et peuvent également jouer un rôle dans la réactivation d'EBV (Chene *et al.*, 2007).

2.2.2. Lymphome de Hodgkin

Dans les pays occidentaux, les lymphomes de Hodgkin (LH) représentent environ 1% des cancers développés chaque année, et environ 20-30% d'entre eux sont associés à l'EBV. Le LH se caractérise par une prolifération de cellules lymphoïdes B atypiques malignes : les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg (HRS), qui représentent environ 1% de la population cellulaire dans la tumeur. Par immunohistochimie, l'EBV est retrouvé dans les cellules HRS dans 30 à 50% des cas dans les pays occidentaux et jusqu'à 90% des cas dans les pays en développement. Les cellules HRS infectées par EBV expriment les protéines de latence EBNA1, LMP1 et LMP2, caractéristiques d'une latence de type II. L'amplification de l'ADN viral permet de mettre en évidence l'EBV également dans les lymphocytes B normaux entourant les cellules HRS dans 60 à 80% des cas. Plusieurs études utilisant des techniques d'hybridation ont montré la clonalité du virus dans les tissus de LH, démontrant que l'infection par l'EBV des cellules B précède leur cancérisation et leur expansion clonale (Dolcetti and Boiocchi, 1998). L'EBV est donc bien impliqué dans la pathogenèse du LH. De plus, une charge virale EBV plasmatique supérieure à 600 copies/ml au moment du diagnostic de LH et six mois après le début du traitement semble être un facteur de mauvais pronostique pour les patients (Kanakry *et al.*, 2013).

Nous reviendrons plus en détails sur le LH, son épidémiologie, sa pathogenèse et l'implication d'EBV dans le chapitre consacré au LH.

2.2.3. Lymphome des cellules T/NK

Bien que la cible préférentielle d'infection par l'EBV soit les lymphocytes B, l'EBV a été relié également à différents lymphomes touchant les lymphocytes T et NK (natural killer). Un exemple commun en Asie est un lymphome extranodal qui se présente sous forme d'une lésion érosive dans la cavité nasale. Ce type de lymphome dériverait de cellules cytotoxiques infectées par l'EBV ayant pour origine soit un lymphocyte T, soit une cellule NK (Young and Rickinson, 2004).

3. Carcinomes associés à l'EBV

3.1. Carcinome indifférencié du cavum

Le carcinome indifférencié du cavum, cancer des cellules épithéliales, est très répandu en Chine, où il représente 20% des cancers. Il est présent également en Asie du sud-est et autour du bassin méditerranéen. Les patients atteints de carcinome du cavum présentent un taux élevé d'anticorps anti-EBV, et la présence d'ADN d'EBV a été observée dans 100% des carcinomes indifférenciés du cavum étudiés, montrant une association forte entre le virus et ce carcinome. L'antigène nucléaire EBNA1 est exprimé dans 100% des cas et on retrouve également l'expression des protéines de latence LMP2A, LMP2B et les transcrits BARTs. La protéine de latence LMP1 n'est exprimée que dans environ 20% des cas mais participerait alors au développement du carcinome et au fort potentiel métastatique de ces cellules tumorales, notamment en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (Raab-Traub, 2002; Yoshizaki et al., 2013). L'hybridation d'ADN dans les tissus cancéreux a démontré la monoclonalité des génomes viraux présents, indiquant que l'infection par EBV a lieu avant l'expansion clonale (Raab-Traub and Flynn, 1986). Des études plus récentes utilisant la PCR quantitative en temps réel pour mesurer l'ADN d'EBV dans le sang de patients avec un carcinome du cavum ont montré que le taux d'ADN d'EBV avant le traitement est étroitement associé avec la survie globale et que le niveau d'ADN EBV post-traitement est un bon marqueur de prédiction de la survie globale (Chan et al., 2002; Young and Rickinson, 2004).

3.2. Cancer du sein

L'étude de l'implication d'EBV dans le développement des cancers du sein montre des disparités dans la détection du génome et de l'expression des protéines virales. En effet selon les techniques utilisées le pourcentage de tumeurs EBV-positives peut varier de 6,7 à 51%. Comme EBV n'est détecté que dans un nombre limité de cas de cancers du sein, le fait qu'il en soit un agent étiologique a toujours été controversé. Il pourrait contribuer à la carcinogenèse en augmentant les propriétés oncogéniques de la tumeur telles que l'angiogenèse, l'invasivité ou le développement de métastases (Arbach *et al.*, 2005). Récemment, une méta-analyse a montré qu'EBV est associé à un plus grand facteur de risque de développer un cancer du sein (Huo *et al.*, 2012) et une équipe française a mis en évidence que la présence d'EBV dans les cancers du sein est associée à un phénotype plus agressif, plus fréquemment négatif aux récepteurs à œstrogène, et à un stade histologique plus avancé (Mazouni *et al.*, 2011).
3.3. Carcinome gastrique

Les plus importants facteurs de risque pour ce cancer sont les prédispositions génétiques et les facteurs environnementaux. EBV n'est retrouvé que dans 10% des adénocarcinomes gastriques. Il exprime alors une latence de type II, similaire à celle des carcinomes du cavum, avec expression des protéines de latence EBERs, EBNA1, LMP2a et BARTs, mais pas d'expression de LMP1 ni des autres EBNAs. Les carcinomes gastriques EBV-positifs montrent des caractéristiques phénotypiques et cliniques distinctes par rapport aux tumeurs EBV-négatives, dont une augmentation de la survie des patients (Lee *et al.*, 2004). Il existe d'importantes variations géographiques à l'association avec EBV, dûes peut-être à des différences ethniques ou génétiques. Le rôle précis d'EBV dans la pathogenèse du carcinome gastrique reste à déterminer, mais l'absence d'EBV dans les lésions pré-malignes suggère que l'infection virale arrive tardivement dans la carcinogénèse (Zur Hausen *et al.*, 2004).

4. Maladies auto-immunes

L'EBV est de plus en plus souvent mis en cause dans certaines pathologies auto-immunes comme le lupus érythémateux, la sclérose en plaque, l'arthrite rhumatoïde ou le syndrome de Sjögren. Ces pathologies se développent souvent chez des patients ayant un terrain génétique prédisposant, mais elles mettent également en jeu des facteurs hormonaux, environnementaux et infectieux. L'EBV est un candidat plausible dans la physiopathologie de ces maladies. En effet, on détecte des titres élevés d'anticorps anti-EBV dans les sera de ces patients. De plus, les personnes ayant fait une mononucléose infectieuse auraient un facteur de risque deux fois plus élevé que la population générale de développer une sclérose en plaque (Handel *et al.*, 2010). Mais le mécanisme par lequel l'EBV contribue à la survenue de ces pathologies n'est pas encore élucidé (Toussirot and Roudier, 2008 ; Lossius *et al.*, 2012).

La protéine de latence membranaire LMP1

La protéine de latence membranaire LMP1 a été décrite très tôt comme étant la principale protéine oncogène d'EBV. En effet, LMP1 est essentielle pour la transformation des lymphocytes B in vitro (Kaye *et al.*, 1993). Dans les fibroblastes de rongeurs, LMP1 induit des changements morphologiques, une perte d'inhibition de contact, permet la croissance cellulaire en l'absence de sérum et favorise la formation de tumeurs chez la souris Nude (Wang *et al.*, 1985). De plus, sa présence dans les cellules tumorales de différents cancers comme les lymphomes de Hodgkin et les carcinomes du cavum suggère que LMP1 pourrait jouer un rôle dans le développement des pathologies associées à l'EBV.

I. Généralités

1. Description

LMP1 est une protéine virale exprimée par les cellules infectées par l'EBV pendant la phase de latence, lorsque le génome viral est réprimé afin de persister dans les cellules de l'hôte infecté. LMP1 est exprimée dans les latences de type II, comme dans le cas des lymphomes de Hodgkin, les carcinomes du cavum et les lymphomes T/NK et dans les latences de type III comme les lymphoproliférations malignes et les lignées cellulaires lymphoblastoides. C'est l'une des protéines virales nécessaires à la transformation et à l'immortalisation des cellules infectées.

Le gène *BNLF1*, codant pour la protéine LMP1, se compose d'une partie codante de 1318pb répartie en 3 exons, séparés par deux introns de 78 et 76 pb. Durant la latence, *BNLF1* peut être exprimé à partir de deux promoteurs : le promoteur proximal ED-L1 (EcoRI D fragment-located LMP1 promoter) et le promoteur distal TR-L1 (Terminal repeat-located LMP1 promoter), générant respectivement des ARNm de 2,8kb et 3,5kb (Figure 8).



Figure 8 : Structure du gène BNLF1

Les deux promoteurs de LMP1 sont activés différentiellement en fonction du type de latence virale. Dans les lymphocytes B exprimant une latence de type III, le gène *BNLF1* est exprimé à partir du promoteur ED-L1. Dans ce cas, le transactivateur principal du promoteur ED-L1 est la protéine virale EBNA2, qui agit comme un cofacteur pour favoriser la fixation des facteurs de transcription RBP-Jk et PU.1 sur le promoteur de LMP1 (Johannsen *et al.,* 1995). EBNA-LP stimule l'activation transcriptionnelle d'EBNA2 (Harada and Kieff, 1997), tandis que les protéines EBNA3 (3A, 3B et 3C) régulent négativement la transactivation du promoteur ED-L1 par EBNA2 en se liant à la protéine RBP-Jk (Robertson *et al.,* 1996). Lors des latences de type II, où EBNA2 n'est pas exprimée, les deux promoteurs de LMP1 peuvent être activés par des facteurs de transcription cellulaires comme STAT (Chen *et al.,* 2001). D'autres protéines virales peuvent encore activer l'expression de *BNLF1* comme RK-BARF0 (Kusano and Raab-Traub, 2001) et la protéine du cycle lytique Rta (Chang *et al.,* 2004).

2. Structure

LMP1 est une protéine transmembranaire de 386 acides-aminés, avec une masse moléculaire de 63kDa. Elle est constituée de trois domaines (Figure 9) :

- un **domaine N-terminal** cytosolique très court (résidus 1-23), permettant l'ancrage de la protéine à la membrane plasmique et gérant sa dégradation par le protéasome par l'intermédiaire d'un site d'ubiquitinylation (Aviel *et al.,* 2000).

- un **domaine transmembranaire** composé de six hélices α (résidus 24-186), impliqué dans l'oligomérisation de LMP1. Un mutant de LMP1 délété de ses 43 premiers acides-aminés, correspondant au domaine N-terminal et au premier domaine transmembranaire, est capable de s'accumuler à la membrane plasmique mais ne s'oligomérise pas et n'est pas capable d'induire la transformation des lymphocytes B (Kaye *et al.*, 1993). Cela souligne l'importance de cette région et de l'oligomérisation de LMP1 dans le processus de transformation cellulaire.

- une **longue queue cytosolique C-terminale** (résidus 187-386) dans laquelle ont été décrits trois domaines fonctionnels CTAR1, CTAR2 et CTAR3 (C-Terminal Activating Region) interagissant avec de nombreux facteurs cellulaires et permettant l'intervention de LMP1 dans différentes cascades de signalisation cellulaire (Figure 10).



Figure 9 : Représentation linéaire de la protéine LMP1

II. Mécanisme d'action et potentiel oncogène de LMP1

LMP1 agit comme un récepteur constitutivement actif, apparenté fonctionnellement aux membres de la superfamille des récepteurs au TNF- α (TNFR), comprenant par exemple le CD30, le CD40 et le TNFR-1 (Gires *et al.,* 1997). Grâce à ses domaines CTAR, LMP1 intervient dans la signalisation cellulaire en interagissant avec les protéines TRAF (TNF receptor associated factor) et les protéines TRADD (TNF receptor associated death domain). La principale voie de signalisation activée par LMP1 est la voie NF- κ B, mais LMP1 active également d'autres cascades de kinases comme les MAPK, PI3K, JAK/STAT ou encore JNK/AP1. L'intervention de LMP1 dans la signalisation cellulaire aboutit, comme pour le CD40, à l'expression de cytokines et de protéines anti-apoptotiques, dans le but de favoriser la survie, la prolifération et la croissance cellulaire (Figure 10).



Figure 10 : Comparaison de LMP1 et du TNFR CD40. schéma des partenaires cellulaires de LMP1 et CD40 et des principales voies de signalisation cellulaires activées (d'après Dolcetti *et al.,* 2001)

1. Domaines effecteurs et partenaires cellulaires de LMP1

Le domaine CTAR1 est essentiel à la transformation des lymphocytes B par EBV (Kaye *et al.,* 1995). Il est impliqué dans l'activation des voies NF-κB, MAPK et PI3K par l'intermédiaire de plusieurs protéines TRAF (1,2,3,5) (Ersing *et al.,* 2013) (Figure 11). Les TRAF (TNF-Receptor Associated Factors) sont une famille de protéines adaptatrices cytosoliques associées aux TNFR, impliquées dans la survie, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaire (Soni *et al.,* 2007). Un motif consensus de fixation des TRAF a été identifié et est retrouvé dans le CTAR1 de LMP1 : P₂₀₄XQXT₂₀₈ (X étant un acide aminé quelconque) (Devergne *et al.,* 1996).

Le domaine CTAR2 n'est pas nécessaire à la transformation des lymphocytes B par EBV mais il contribue à une plus forte croissance des cellules à faible densité cellulaire (Kaye *et al.,* 1999). Il active les voies de signalisation NF-κB, MAPK et IRF7 par l'intermédiaire des protéines TRADD, RIP et BS69 grâce à un motif de liaison Y₃₈₄YD₃₈₆ (Dawson *et al.,* 2012; Ersing *et al.,* 2013). TRADD permet l'interaction de LMP1 avec la protéine TRAF2 et l'activation des voies NF-κB et MAP kinases (Kaye *et al.,* 1996). La protéine BS69 se lie à TRAF6 et active les voies de signalisation JNK et NF-κB (Wan *et al.,* 2006). TRAF6 peut également être recruté au niveau du CTAR2 par l'intermédiaire des protéines TRADD et RIP, activant ainsi le facteur de transcription IRF7. IRF7 joue un rôle dans le contrôle de la sécrétion des interférons de type I lors de l'infection par des pathogènes (Ning *et al.,* 2011). A travers sa liaison à TRADD, RIP et BS69, le CTAR2 est impliqué dans la régulation de la survie cellulaire, de l'apoptose, de la sécrétion de cytokines et des réponses interféron (Figure 11).

Le domaine CTAR3, situé entre les deux domaines CTAR1 et CTAR2, possède un domaine riche en proline, permettant potentiellement de recruter la kinase JAK3 et d'activer STAT3 (Gires *et al.,* 1999). Le domaine CTAR3 n'est pas nécessaire pour la transformation des lymphocytes par EBV (Izumi *et al.,* 1999). En revanche, LMP1 interagirait au niveau de CTAR3 avec la protéine Ubc9, enzyme impliquée dans les processus de sumoylation, afin de favoriser la migration cellulaire (Bentz *et al.,* 2011).



Figure 11 : Implication de LMP1 dans la signalisation cellulaire. Description détaillée des partenaires cellulaires interagissant avec les régions activatrices CTAR1 CTAR2 et CTAR3 de LMP1, des voies de signalisation cellulaire activées et de leur impact dans les processus cellulaires. (D'après Dawson *et al.*, 2012)

2. Voies de signalisation impliquées

2.1. NF-κB

La voie NF- κB est la principale voie de signalisation activée par LMP1. Elle sera décrite plus en détail dans les voies de signalisation impliquées dans la pathogenèse du LH. Grâce à ces domaines CTAR1 et CTAR2, LMP1 est capable d'activer NF-κB à la fois par la voie classique et par la voie alternative. Les protéines impliquées dans la voie NF-κB ont été récemment étudiées par screening de librairies de siARN. Neuf protéines spécifiquement induites par LMP1 ont été identifiées, dont la plupart sont des enzymes impliquées dans la dégradation de l'inhibiteur IκBα (Gewurz *et al.*, 2012). C'est par la voie NF-κB que LMP1 induit notamment la surexpression et l'activation de la protéine kinase oncogène TPL2, protéine fréquemment exprimée dans les biopsies de LH et de carcinome du cavum associés à l'EBV (Eliopoulos *et al.*, 2002). Le fait qu'un blocage de la voie NF-κB par LMP1 est un mécanisme essentiel à la survie cellulaire des cellules infectées par EBV (Cahir-McFarland *et al.*, 2004) (Figure 11).

2.2. MAP kinases

Les MAP Kinases sont activées par différents stimuli comme des facteurs de croissance, des cytokines ou des signaux de stress. Leur mécanisme d'activation est basé sur le principe d'une cascade où une MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) active par phosphorylation une MAPKK (MAP kinase kinase), qui active à son tour une MAPK (MAP kinase), activant finalement des facteurs de transcription. La voie des MAP kinases intervient ainsi dans la régulation de la division, la prolifération et la croissance cellulaire. Les principales MAPK induites par LMP1 sont ERK1 et ERK2 (Extracellular Regulated Kinases), JNK (c-Jun amino-terminal kinases) et p38.

- **JNK**: LMP1 active la voie JNK en recrutant TRAF6 au niveau de son domaine CTAR2 par l'intermédiaire de la protéine BS69 (Eliopoulos and Young, 1998; Wan *et al.*, 2006). TRAF6 recrute ensuite le complexe TAK1-TAB1-TAB2, où TAK1 est une MAPKKK essentielle à l'activation des kinases JNK. L'induction de l'activation de JNK par LMP1 conduit à l'augmentation de l'expression du facteur de transcription AP1 (Kieser *et al.*, 1997) et à la régulation de l'apoptose et de l'induction des cytokines par les cellules (Figure 11).

- **P38**: Il existe 4 isoformes de protéines kinases p38 (α , β , γ et δ), connues également sous le nom de SAPK (stress-activated protein kinase). Les deux domaines CTAR1 et CTAR2 peuvent induire la voie p38 par l'intermédiaire de TRAF2. Au niveau du domaine CTAR1, l'activation de la voie p38 va permettre l'activation de facteurs de transcription comme ATF2 et Elk-1 (Raingeaud *et al.*, 1996) et

favoriser la production des interleukines IL-6 et IL-8 (Eliopoulos *et al.,* 1999). Au niveau du domaine CTAR2, le recrutement de TRAF2 par l'intermédiaire de TRADD permet d'activer la voie p38 et le complexe JNK/AP1. L'activation de la voie p38 peut également avoir lieu par le recrutement de TRAF6 par TRADD au niveau du CTAR2, ce qui active la kinase IRAK1 (IL-1 receptor associated kinase 1) activant elle-même la voie p38 et le facteur de transcription ATF2. Toutes les voies d'activation des protéines p38 conduisent à réguler l'expression des cytokines et des gènes régulateurs de l'apoptose comme p53 (Li *et al.,* 2007).

- **ERK** : L'activation de la voie ERK est médiée principalement par l'intermédiaire du domaine CTAR1. La cascade d'activation de la voie ERK implique le recrutement de TRAF au niveau du CTAR1, puis l'activation d'une MAPKKK (Raf) et d'une MAPKK (MEK1/2) (Dawson *et al.*, 2012). Récemment, la protéine kinase C δ a été identifiée comme un nouvel effecteur clé dans l'activation de la voie ERK par LMP1 (Kung *et al.*, 2011). L'activation de la voie ERK par LMP1 permet d'intervenir dans les processus de prolifération et de mobilité cellulaire.

2.3. JAK/STAT

L'activation des Janus-kinases induit la phosphorylation de nombreux substrats, cruciale pour la transduction des signaux de cytokines. Le plus important de ces substrats est la famille d'activateurs de transcription STAT. STATs sont des facteurs de transcriptions latents, dans le cytoplasme, et activés par la phosphorylation d'un seul résidu tyrosine. Les facteurs de transcription STAT phosphorylés se dimérisent et se relocalisent dans le noyau pour jouer leur rôle d'activateurs de la transcription (Figure 12). Il existe 7 membres de la famille STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, et chacun est activé par des cytokines particulières (Leonard and O'Shea, 1998).





La voie JAK/STAT est activée par LMP1. Par exemple LMP1 induit, par l'intermédiaire de JAK3 et ERK1/2, l'expression de STAT3 dans des lignées cellulaires dérivées de carcinome du cavum. STAT3 est bien connu pour intervenir dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose et a plus récemment été également impliqué dans l'angiogenèse et l'invasion des tissus. L'activation de STAT3 par LMP1 est donc un mécanisme contribuant à l'invasivité des carcinomes du cavum (Wang *et al.,* 2010). Il existe un site riche en proline dans le domaine CTAR3, correspondant à un site potentiel d'activation de JAK3 (Gires *et al.,* 1999) (Figure 11). L'activation de JAK3 par le CTAR3 reste cependant controversée car la délétion de cette région n'empêche pas le recrutement et l'activation de JAK3 par LMP1 (Higuchi *et al.,* 2002).

2.4. PI3Kinases

Les Phosphatidyl-inositol-3 kinases (PI3K) sont une famille d'enzymes souvent impliquées dans la pathogénicité des cancers du fait de leur participation à la régulation de la croissance, la prolifération, la différenciation et la mobilité cellulaire. L'activation de la voie PI3K par LMP1 est médiée par le CTAR1 (Mainou et al., 2005). En activant la voie PI3K, LMP1 participe au processus de transition épithélio-mésenchymateuse et donc au développement des métastases (Morris et al., 2008) (Figure 11).

3. Propriétés de LMP1

Toutes les voies de signalisation dans lesquelles LMP1 est impliquée lui permettent d'intervenir dans différentes étapes de la vie cellulaire telles que la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose. LMP1 exerce des effets pléiotropes dans les cellules infectées par EBV, induisant des changements phénotypiques tels que l'induction de molécules d'adhésion de surface ou des marqueurs d'activation, ou bien encore permettant aux cellules de moduler la réponse immune en contrôlant l'expression des cytokines.

3.1. Altérations phénotypiques

Dans le but de contrôler l'immunité cellulaire lors de l'infection par EBV, LMP1 induit l'expression de marqueurs d'activation comme le CD21 (récepteur impliqué dans l'activation des lymphocytes B par le complément et récepteur cellulaire d'EBV), le CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), le CD80 et le CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B) (Dudziak *et al.*, 2003), le CD30, le CD40 et l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) (Kung and Raab-Traub, 2008) (Wang *et al.,* 1990). LMP1 est également capable d'interférer dans la reconnaissance des cellules infectées par EBV par les lymphocytes T cytotoxiques environnants en augmentant l'expression des transporteurs d'antigènes TAP1 et TAP2 (transporter associated with antigen processing) et des molécules du CMH de classe I et II (Rowe *et al.,* 1995).

LMP1 est impliquée par ailleurs dans la surexpression de molécules d'adhésion cellulaire telles que LFA1, LFA3, ICAM1, CD44 (Kieff and Rickinson, 2007). Grâce à la présence à leur surface de LFA1 et ICAM1, les LCL se reconnaissent et interagissent (Park and Faller, 2002). Ce rapprochement favorise les échanges de cytokines et de facteurs de croissance, tout cela dans le but de permettre une meilleure croissance et survie cellulaire. Dans le cas des cellules épithéliales, LMP1 peut à l'inverse être responsable d'une diminution de l'expression de certaines molécules d'adhérence comme la E-cadhérine, ce qui va favoriser le détachement de la cellule tumorale et promouvoir le développement de métastases (Tsai *et al.,* 2002). En induisant de nombreux changements phénotypiques, LMP1 participe donc au processus de transformation cellulaire.

3.2. Prolifération cellulaire

LMP1 est essentielle à la prolifération cellulaire des lymphocytes B, notamment en activant les voies de signalisation JNK, NF-KB et PI3K (Kilger *et al.*, 1998). LMP1 est capable d'agir sur les points de contrôle du cycle cellulaire afin de l'accélérer et de favoriser la prolifération cellulaire. Par exemple, LMP1 diminue l'expression de p16-INK4a et p21, deux protéines bloquant le cycle cellulaire en phase G1, et induit l'expression de CDK2 et la cycline D1, qui elles, au contraire, favorisent le passage de la phase G1 à la phase S (Lo *et al.*, 2004). En diminuant l'activation de la protéine Chk1, LMP1 accélère également le passage de la phase G2 à M du cycle cellulaire (Deng *et al.*, 2012).

Par ailleurs, LMP1 permet aussi aux LCLs et aux cellules épithéliales infectées par EBV de résister aux effets cytostatiques et apoptotiques du TGF-β. Le TGF-β bloque les cellules en phase G1 du cycle cellulaire en induisant l'inhibiteur du cycle cellulaire p21waf1. LMP1 empêcherait l'expression de p21waf1 par l'intermédiaire des voies ERK et NF-kB, permettant la poursuite du cycle cellulaire (Fukuda *et al.,* 2002).

Cependant, LMP1 est également fréquemment décrite comme ayant des effets cytostatiques voire même cytotoxiques lorsqu'elle est exprimée à de très forts taux (Hammerschmidt *et al.*, 1989). Une équipe anglaise a montré que LMP1 induit une cytostase sur différentes lignées cellulaires dérivées de lymphocytes B. En effet, l'étude du cycle cellulaire des cellules exprimant LMP1 montre une accumulation de cellules en phase G2/M (Floettmann *et al.*, 1996). LMP1 est capable d'inhiber le

facteur eIF2, en favorisant sa phosphorylation par la kinase PERK. Cela provoque une inhibition de la traduction dans la cellule et donc une cytostase (Lam *et al.*, 2004; Lee and Sugden, 2008b). Une étude implique la partie N-terminale et les domaines transmembranaires de LMP1 dans le phénomène de cytostase (Kaykas and Sugden, 2000), alors qu'une autre étude met en évidence que la cytotoxicité due à LMP1 est due au recrutement de TRADD au niveau des CTAR de la partie C-terminale de LMP1 (Brocqueville *et al.*, 2013). Cette dernière équipe de recherche française suggère que les propriétés cytotoxiques et oncogéniques de LMP1 ne sont pas contradictoires et pourraient intervenir toutes deux lors de la transformation cellulaire. Dans une population cellulaire, les cellules résistantes à la cytotoxicité induite par LMP1 seraient précisément celles qui ont également les capacités oncogènes de LMP1.

3.3. Différenciation cellulaire

Dans les cellules épithéliales humaines, *in vitro*, LMP1 empêche la différenciation cellulaire (Dawson *et al.*, 1990). Récemment, une équipe de chercheurs anglais a mis en évidence que LMP1 diminue l'expression de BLIMP1α dans les cellules B du centre germinatif. BLIMP1α est un facteur de transcription nécessaire à la différenciation en plasmocytes, réprimant habituellement l'oncogène MYC. En inhibant BLIMP1α, LMP1 favorise l'expression de l'oncogène *c-myc* et participe à la tumorigenèse. De plus, la différenciation cellulaire des cellules B mémoire en plasmocytes est étroitement liée avec une reprise du cycle lytique d'EBV. La surexpression de BLIMP1α induit le cycle lytique, la production de nouvelles particules virales et la mort de la cellule infectée (Vrzalikova *et al.*, 2011). Un équilibre nécessaire s'établit entre la persistance d'EBV à l'état latent dans les cellules B mémoires et sa propagation en réactivant le cycle lytique. LMP1 permet au virus de freiner la différenciation afin de persister à l'état latent dans les cellules B mémoires.

3.4. Régulation de l'apoptose et des gènes suppresseurs de tumeur

Une des propriétés oncogènes principales de LMP1 est sa capacité à protéger de l'apoptose les cellules infectées par EBV. Pour cela, LMP1 peut induire des protéines anti-apoptotiques ou bloquer l'effet de gènes suppresseurs de tumeur codant pour des protéines pro-apototiques.

Par exemple, LMP1 est capable de bloquer l'apoptose induite par la protéine suppressive de tumeur p53 de plusieurs façons. LMP1 induit l'expression de la protéine anti-apoptotique A20, contrôlant négativement l'apoptose induite par p53 (Fries *et al.*, 1996). LMP1 induit également l'expression de l'antagoniste de p53 Δ Np73 α , par l'intermédiaire de la voie JNK (Accardi *et al.*, 2013). Par ailleurs, l'activation par LMP1 de la voie MAP-kinase permet de réguler la phosphorylation de p53

et donc son état d'activation (Li *et al.,* 2007). Enfin, LMP1 agit avec Bcl-2 afin de contourner la diminution de croissance induite par p53 (Sheu *et al.,* 2004).

Une étude comparant l'expression de mi-ARN dans des biopsies de carcinome du cavum et des tissus normaux a mis en évidence que LMP1 diminue l'expression des mi-ARN suppresseurs de tumeurs et, au contraire, augmente l'expression des mi-ARN oncogènes (Chen *et al.,* 2009). Par exemple, LMP1 diminue, par l'intermédiaire de la voie NF-κB, l'expression de RASSF1, un gène suppresseur de tumeur fréquemment inactivé dans les carcinomes du cavum (Man *et al.,* 2007).

L'induction par LMP1 de certaines interleukines impliquées dans les processus inflammatoires comme IL1, IL-6 et IL-10 protège également les cellules de l'apoptose en activant les voies PI3K et STAT (Chen *et al.*, 1999). En effet, l'activation la voie PI3K/Akt par LMP1 inactive les protéines pro-apoptotiques Foxo3a et Bad. Par l'intermédiaire de la voie NF-KB, LMP1 réprime l'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (Grimm *et al.*, 2005) et induit, au contraire, l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que A20, Mcl-1, c-IAP2 (inhibiteur de caspase) et la survivine (Dawson *et al.*, 2012).

Paradoxalement, dans certains cas, LMP1 a également été décrite comme capable d'induire l'apoptose. Dans les LCL, LMP1 augmente l'expression du récepteur pro-apoptotique Fas, par l'intermédiaire de la voie NF-κB. Les cellules sont alors plus sensibles au Fas-Ligand sécrété par les lymphocytes T cytotoxiques environnants (Le Clorennec *et al.*, 2006 et 2008). LMP1 induit la mort cellulaire dans des cellules épithéliales HEK en induisant la caspase-3 par l'intermédiaire de la voie NF-κB (Nitta *et al.*, 2003) et potentialise l'apoptose induite par le FAS-ligand dans les cellules HeLa (Zhang *et al.*, 2002 et 2005).

3.5. Pouvoir métastatique

Parfois, des cellules se détachent du site initial de la tumeur par une transition épithéliomésenchymateuse (TEM). Elles disséminent alors dans l'organisme, ce qui peut aboutir à la formation de métastases. Plusieurs études ont mis en évidence une corrélation entre la présence de LMP1 dans une tumeur et la formation de métastases (Gou et al., 2003; Yoshizaki, 2002).

Dans plusieurs types cellulaires, le TGF- β coopère avec des récepteurs tyrosine kinases ou Ras pour induire la TEM (Kang and Massague, 2004). LMP1 induit le TGFb (Sides *et al.*, 2011) et, par l'intermédiaire des voies ERK/MPAK et PI3K, participe à la TEM (Dawson *et al.*, 2008).

LMP1 diminue l'expression du facteur d'adhésion cellulaire l'E-cadhérine, soit en promouvant la méthylation de son promoteur par une ADN méthyl-transférase (Tsai *et al.,* 2002), soit en réprimant les facteurs de transcription Twist et Snai1 (Horikawa *et al.,* 2007). Ainsi, en diminuant l'expression de la E-cadhérine et en favorisant son remplacement par la N-cadhérine, LMP1 promeut la mobilité cellulaire et l'invasion d'autres tissus (Fahraeus et al., 1992; Shair *et al.,* 2009).

Les métalloprotéases de matrice (MMP) dégradent les éléments de la matrice extra-cellulaire, favorisant le déplacement des cellules. LMP1 augmente l'expression des MMP1 et MMP9 (Horikawa *et al.,* 2000; Lu *et al.,* 2003) et inhibe, par la voie ERK/Sp1, l'expression du gène suppresseur de métastases RECK, qui régule habituellement négativement l'expression des MMP (Liu *et al.,* 2003). La TEM induite par LMP1 est également associée avec l'induction de l'activateur de plasminogène urokinase et du facteur de transcription Ets1, dont l'activité promeut la mobilité cellulaire et l'invasion en régulant la signalisation des intégrines et l'expression des MMP (Kim *et al.,* 2000; Tsao *et al.,* 2002).

Par ailleurs, LMP1 induit l'expression de facteurs favorisant l'angiogenèse, processus important dans le développement de métastases. Par exemple, LMP1 induit la sécrétion de VEGF (vascular endothelial growth factor) dans les cellules épithéliales (Murono *et al.*, 2001), par un mécanisme impliquant l'induction de COX-2, HIF-1 α , et MMP-9 (Dawson *et al.*, 2012). L'induction de l'IL-8 par LMP1 corrèle avec une plus forte angiogenèse dans les cas de carcinome du cavum. Cet effet est dû en partie à l'activation de la voie p38 et à la liaison de NF- κ B et ATF2 au promoteur de l'IL-8 (Eliopoulos *et al.*, 1999; Yoshizaki *et al.*, 2001).

3.6. Modulation de la réponse immune et de l'expression des cytokines

LMP1 a un rôle ambigu au niveau de la signalisation cellulaire. En effet, une expression excessive de LMP1 induit l'autophagie dans des cellules en culture (Lee and Sugden, 2008a), provoquant leur lyse prématurée et favorisant l'assimilation des débris par les cellules présentatrices de l'antigène. Cependant, LMP1 module la réponse immune par un grand nombre de procédés dans le but de faire échapper la cellule infectée au contrôle du système immunitaire. De façon indirecte, LMP1 interfère dans la sécrétion des chimiokines comme CCL17 et CCL22, de cytokines telles que IL-6 et IL-10 ou encore des molécules d'adhésion (LFA, ICAM, CD18). LMP1 interfère également dans la régulation de gènes impliqués dans la prise en charge des antigènes et leur présentation, en augmentant l'expression de molécules HLA de classe II dans des lignées de lymphocytes B (Middeldorp and Pegtel, 2008).

LMP1 est également capable d'influencer son environnement de façon directe. En effet, les lymphocytes B et les cellules épithéliales excrètent LMP1 sous forme d'exosomes. Ces exosomes peuvent interagir avec les cellules environnantes et contribuer à moduler la réponse immune. Par exemple, des exosomes contenant LMP1 inhibent la croissance des PBMC et diminuent l'activation des lymphocytes T (Flanagan *et al.*, 2003; Keryer-Bibens et al., 2006).

L'interaction entre LMP1 et les cytokines est réciproque. Une équipe propose que l'expression de LMP1 dans les lymphocytes B infectés par EBV lors de la latence de type II ne soit pas physiologique mais induite par les cytokines présentes dans l'environnement cellulaire des centres germinatifs ou des tissus tumoraux, notamment dans le cas des lymphomes de Hodgkin. Cela expliquerait l'hétérogénéité d'expression de LMP1 entre les cellules normales et malignes (Kis *et al.,* 2006). En effet, si EBNA2 est le transactivateur principal du promoteur LMP1 lors de la latence de type III, il n'est pas exprimé dans la latence de type II. Différentes cytokines seraient alors responsables de l'activation de la transcription de LMP1, incluant l'IL-4, IL-10, IL-13, IL-15, IL-21, en fonction du contexte cellulaire (Salamon *et al.,* 2012).

III. Les variants de LMP1

1. Polymorphisme de LMP1

De par sa fréquente expression dans les cellules tumorales, son caractère oncogène et son implication dans la pathogenèse de nombreuses maladies associées à l'EBV, LMP1 a été souvent recherché et étudié dans divers échantillons biologiques. Plusieurs variants ont pu être décrits, dont les séquences sont comparées à la souche de référence B95-8. La classification la plus couramment utilisée regroupe les variants LMP1 selon leur séquence en acides-aminés dans la partie C-terminale (199-377). Des noms leur ont été attribués en fonction de la zone géographique d'où l'isolat clinique est issu : Alaskan, China1, China2, China3, Mediterranean+ (Med+), Med- et North Carolina (NC) (Edwards *et al.*, 1999). La distribution géographique de ces génotypes est décrite dans le tableau 2. Les différences entre les génotypes se portent sur la présence ou l'absence d'une délétion de 30-pb, présente dans les génotypes China1, China3 et Med+, et sur la présence de différents points de mutation dans la partie C-terminale de LMP1.

D'autres classifications ont été proposées, regroupant les variants de LMP1 en 4 groupes A, B, C, D en fonction des variations de la séquence entière de LMP1 (Sandvej *et al.,* 1997) ou en 22 classes selon les variations de la partie C-terminale de LMP1 plus étendue que celle d'Edwards (Walling *et al.,* 1999). Tableau 2: Distribution géographique des génotypes de LMP1 selon la classification d'Edwards(Edwards et al., 1999)

	China 1	China 2	China 3	Med	Alaskan	NC	B95-8
Asie	86%	8%	1%	1%			5%
Méditerranée + Afrique				90%			10%
Europe	45%			11%		9%	35%
Etats-Unis	45%	5%		22%	1%	6%	21%
Alaska					100%		

2. Les variants LMP1-del30 et LMP1-del69

Le variant LMP1-del30, délété de 30pb dans la partie C-terminale de LMP1, correspondant à une perte de 10 acides-aminés en position 346-355 de la protéine, a soulevé beaucoup d'intérêt parmi les cliniciens et les chercheurs. Ce variant a été décrit initialement dans des carcinomes du cavum en Asie, où la délétion de 30-bp est retrouvée de façon endémique dans 75% de la population générale. Il est également détecté dans d'autres pathologies associées à l'EBV, comme la mononucléose infectieuse, des syndromes lymphoprolifératifs (Barozzi *et al.,* 1999), les lymphomes de Burkitt et les lymphomes de Hodgkin (Tableau3).

Beographique. Le nom			initique enti	e purchaneses		, 2005)
Pathologie	Chine	Reste de	Afrique	Amérique	Amérique	Europe
		l'asie		du Sud	du Nord	
Carcinome du cavum	83,8%	55,1%			11,1% (18)	27,8% (18)
	(857)	(301)				
Lymphome de			38,1% (21)	80,0% (15)		
Burkitt						
Lymphome de	83,1%			60,2% (88)	48,1% (27)	33,9%
Hodgkin	(65)					(277)
Lymphomes associés					47,4% (19)	53,9%
au VIH						(167)
Lymphoproliférations	75,1%	34,0 (47)	25,6% (39)	17,1%	47,9% (48)	33,6%
bénignes et individus	(189)			(175)		(295)
sains						

Tableau 3 : Prévalence du variant LMP1-del30 en fonction de la pathologie et de la zone géographique. Le nombre de cas total étudié est indiqué entre parenthèses. (Chang *et al.,* 2009)

La fréquence de détection du variant LMP1-del30 dans les pathologies associées à l'EBV est souvent proche ou légèrement supérieure à celle observée dans la population générale des personnes saines. Une exception notable, cependant, est le très fort taux d'association du variant LMP1-del30 dans les lymphomes de Hodgkin des patients VIH+. En effet, dans les pays occidentaux, l'association de l'EBV aux lymphomes de Hodgkin est elle-même plus importante chez les patients VIH+ (80-100%) que chez les patients VIH- (30-40%). Et le variant LMP1-del30 est impliqué dans 80-90% des cas de LH associés au VIH (Dolcetti *et al.,* 1997; Spina *et al.,* 2011).

Une autre délétion a été décrite dans la même région que la délétion del30, quoique beaucoup moins fréquente. Il s'agit d'une délétion de 69pb (LMP1-del69) résultant en une délétion de 23 acides-aminés dans la partie C-terminale de LMP1 (333-355). LMP1-del69 a été décrite dans quelques cas de carcinomes du cavum (Banko et al., 2012; Hadhri-Guiga et al., 2006), dans des syndromes lymphoprolifératifs (Barozzi et al., 1999; Klein et al., 1995) et différents lymphomes, notamment le LH (Knecht *et al.*, 1993; Trimeche *et al.*, 2005).

D'autres délétions ont pu être décrites dans des cas isolés comme une délétion de 3-pb chez un patient développant une mononucléose infectieuse (Berger *et al.,* 1997), une délétion de 15-pb dans un cas de carcinome du cavum (Zhou *et al.,* 2001) ou encore une délétion de 63-pb, isolée d'un patient ayant un LH (Dolcetti *et al.,* 1999).

3. Activités fonctionnelles connues des variants de LMP1 délétés en C-terminal

Par rapport au LMP1 sauvage, les variants délétés dans la partie C-terminale ont été montrés comme étant plus tumorigènes. En effet, LMP1-del30 favorise plus fortement la formation de tumeurs dans des kératinocytes chez la souris SCID (Hu *et al.*, 1993) et les LCL établies avec le variant LMP1-del69 sont capables de former des tumeurs à la fois dans les souris NUDE et SCID (Sandvej *et al.*, 1996). L'expression dans des cellules issues de carcinome du cavum d'un variant LMP1 portant la délétion de 30pb interfère dans l'activation de Chk1, protéine impliquée dans le contrôle du passage de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire. Les cellules passent plus rapidement ce point de contrôle et accumulent des erreurs de réplications et des dommages dans l'ADN. Cette instabilité génomique favoriserait la carcinogenèse (Deng *et al.*, 2012). Le variant LMP1-del30 est également moins immunogène chez la souris que LMP1 sauvage (Trivedi *et al.*, 1994).

Des études dans des lignées cellulaires épithéliales ont permis de mettre en évidence des différences fonctionnelles entre LMP1 sauvage et LMP1-CAO, variant isolé dans les carcinomes du cavum en Asie et comportant la délétion de 30-pb ainsi que d'autres points de mutation. Ces deux

formes de LMP1 induisent l'expression de la protéine anti-apoptotique A20 de manière égale et protègent de façon équivalente contre l'apoptose induite par le TNF-α. En revanche, LMP1-CAO, au contraire de LMP1-WT, n'induit pas l'expression de certaines molécules de surfaces CD40, CD44 et CD54, et n'induirait pas la sécrétion d'IL-6 et IL-8. LMP1-CAO ne serait pas non plus capable d'induire des changements morphologiques ni de bloquer la différenciation cellulaire, contrairement à LMP1-WT (Dawson *et al.*, 2000).

Du point de vue de l'activation des voies de signalisation cellulaire, quelques publications rapportent que le variant LMP1-CAO, active plus fortement la voie NF-κB que LMP1-WT. Des études de chimères de LMP1 précisent que l'activation de la voie NF-κB ne semble pas être dûe à la délétion de 30pb mais à une séquence du domaine transmembranaire de LMP1-CAO (Blake et al., 2001; Johnson et al., 1998). Plusieurs autres études, à l'inverse, montrent que LMP1-del30 et LMP1-del69 stimulent la transcription de NF-κB à un niveau comparable à celui de LMP1-WT (Faumont et al., 2009; Rothenberger et al., 1997). En revanche, les deux variants LMP1-del30 et LMP1-del69 activent plus faiblement que LMP1-WT la transcription du facteur cellulaire AP-1, sans pour autant que cela ait de conséquence sur l'expression de la protéine MMP-9, induite par la voie AP-1 (Dawson *et al.,* 2000; Larcher *et al.,* 2003).

Par ailleurs, le cycle lytique d'EBV peut être réactivé en induisant la transcription de ZEBRA par des esters de phorbol ou des immunoglobulines anti-IgM. L'interaction du CD40 avec son CD40ligand ou l'expression de LMP1 sont capables de réprimer l'activation du facteur de transcription très précoce ZEBRA (Adler *et al.,* 2002) et LMP1-del69 diminue encore plus fortement l'expression de ZEBRA que LMP1-WT, réprimant ainsi le cycle lytique d'EBV (Larcher *et al.,* 2003).

Le lymphome de Hodgkin

I. Généralités

Le LH a été décrit en 1832 par un anatomopathologiste britannique, Thomas Hodgkin. Ce fut le premier lymphome clairement identifié et caractérisé bien que son origine lymphoïde B n'ait été confirmée que récemment (Kuppers *et al.,* 1994). Par la suite, tous les autres lymphomes ont été regroupés sous le terme « non Hodgkiniens », pour les différencier du LH.

1. Epidémiologie

Le LH représente chaque année dans le monde un peu moins de 1% des nouveaux cancers. En France, selon l'institut national du cancer, l'incidence en 2011 a été de 1840 nouveaux cas (920 femmes, 920 hommes), soit 0,5% des cancers diagnostiqués, et 290 personnes sont décédées des suites de leur LH. Deux pics d'incidence sont observés chez les jeunes adultes (15-35ans) et après 55ans.

2. Diagnostic clinique et histologique

Les patients atteints d'un LH présentent des adénopathies superficielles ou profondes et un syndrome B, c'est-à-dire une fièvre prolongée avec éventuellement une perte de poids, de la fatigue et des sueurs nocturnes. Ce tableau clinique peut s'accompagner de prurit, signe d'un syndrome inflammatoire.

Le diagnostic est basé sur l'identification de cellules tumorales typiques dans une biopsie d'infiltration ganglionnaire : les **cellules de Reed-Sternberg**, grandes cellules multinuclées possédant un nucléole basophile volumineux, et des **cellules de Hodgkin**, grandes cellules à noyau simple. Les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg (HRS) sont caractéristiques du LH. Elles dérivent de cellules B du centre germinatif ayant acquis des mutations non fonctionnelles dans le gène de la chaine variable des immunoglobulines et qui échappent à l'apoptose (Kuppers, 2009). Dans le tissu tumoral, les cellules HRS représentent environ 1% des cellules, le reste étant composé d'un infiltrat de différentes cellules du système immunitaire (Figure 13).



Figure 13 : Les cellules de Hodgkin et Reed-Sternberg dans leur microenvironnement (d'après Kuppers, 2009) : exemples de coupes histologiques de LH classique (a) Coloration à l'éosine et hématoxyline d'une biopsie de LH scléro-nodulaire (b) Immunomarquage anti-CD30 (rouge) révélant les cellules de Reed-Sternberg CD30+ (c) Immunomarquage anti-CD3 (rouge) mettant en évidence un infiltrat de lymphocytes T dans la tumeur et autour des cellules de Reed-Sternberg (d) Cellule de Reed-Sternberg avec ses deux noyaux et de volumineux nucléoles denses caractéristiques (diamètre 20-60 µm).

Après un bilan d'extension comprenant une biopsie, un bilan sanguin et des examens d'imagerie, le stade de la maladie est évalué selon la classification d'Ann Arbor, en fonction du nombre de ganglions atteints et de leur localisation.

- Stade I : atteinte d'un unique site ganglionnaire
- Stade II : atteinte d'au moins deux sites ganglionnaires, du même côté du diaphragme
- Stade III : atteinte d'aires ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme
- Stade IV : atteinte d'un ou plusieurs organes extra-lymphatiques (foie, moelle osseuse, poumons)

D'après la classification actuelle de l'OMS, les lymphomes de Hodgkin sont divisés en lymphomes de Hodgkin classiques (cHL), pour lesquels les cellules tumorales sont les cellules HRS, et lymphomes de Hodgkin nodulaires à prédominance lymphocytaire (NLPHL), pour lesquels les cellules tumorales sont des variants des cellules HRS appelés cellules histiolymphocytaires (L&H). Ces deux entités diffèrent de par leur aspect clinique, leur évolution, leur morphologie, l'immunophénotype des cellules tumorales et la composition des cellules dans l'environnement tumoral. Les lymphomes de Hodgkin classiques sont encore divisés en quatre sous-types : scléro-nodulaire, à cellularité mixte, déplété en lymphocytes ou riche en lymphocytes (tableau 4)

	Enfance	Jeunes	adultes	Adultes plus
		adultes		agés
Classe d'âge	≤ 14 ans	15-35 ans	≥ 35 ans	≥ 55 ans
Prévalence des cas de LH	10-12%	50%		35%
Ratio homme:femme	2-3 :1	1 :1 - 1,3 :1		1,2 :1 – 1 :1,1
Histologie				
Lymphome de Hodgkin classique				
Scléro-nodulaire	40-45%	65-80%		35-40%
Cellularité mixte	30-45%	10-25%		35-50%
Déplété en lymphocyte	0-3%	1-5%		2-6%
Riche en lymphocytes	rare	rare		rare
Lymphome de Hodgkin nodulaire à prédominance lymphocytaire (NLPHL)	8-20%	2-8%		7-10%
Association à l'EBV	27-54%	20-25%	34-40%	50-56%
Stade au diagnostic	30-35% au	40% au stao	de III ou IV	55% au stade
	stade III ou IV			III ou IV
	25% avec des symptômes B	30-40% a symptô	wec des mes B	50% avec des symptômes B
Taux de survie à 5 ans	94%	90'	%	65%

Tableau 4. Lpiueiniologie uu minphonie ue noughin en fonction de l'age (Funnett et di., 201)
--

3. Traitement – Pronostic

Les protocoles de traitement standard des lymphomes de Hodgkin prennent en compte les facteurs pronostiques du patient, aussi bien chez les enfants que chez les adultes. La catégorie de risque est déterminée en fonction du stade clinique au diagnostic et d'autres critères pronostiques tels que le sexe, l'âge, l'anémie et le taux de sédimentation (marqueur d'inflammation). Les patients de faible risque recevront un traitement plus léger afin de limiter la toxicité à court et à long terme, tandis que les patients de risque plus élevé auront un traitement intensifié pour améliorer leur pronostic.

Le traitement du LH comprend une chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie. Le protocole de chimiothérapie utilisé en première intention est l'ABVD, il associe l'<u>A</u>driamycine, la <u>B</u>léomycine, la <u>V</u>inblastine et le <u>D</u>éticène. Ces quatres agents anti-cancéreux ont des modes d'action différents et complémentaires afin d'empêcher la prolifération des cellules cancéreuses et de

favoriser leur éradication. Le protocole ABDV s'administre en cycles de 4 semaines, et le nombre de cycles varie de 3 à 8 en fonction du groupe pronostique du patient. La radiothérapie peut être utilisée en complément de la chimiothérapie, elle permet de cibler avec des rayons X précisément les ganglions tumoraux identifiés par imagerie (PET-scan). Les protocoles actuels visent à se passer de la radiothérapie pour les formes de meilleur pronostic (Hoppe *et al.,* 2011).

Le LH est l'un des cancers présentant le meilleur pronostic sur le long terme. Grâce à l'évolution des traitements, la survie à 5 ans est aujourd'hui estimée à près de 84 % toutes formes confondues.

II. Pathogenèse du lymphome de Hodgkin

1. Origine des cellules HRS

Les cellules tumorales HRS et L&H dérivent de lymphocytes B du centre germinatif. Les cellules L&H possèdent encore plusieurs marqueurs de cellules B, il semblerait qu'elles soient à un stade intermédiaire entre les cellules du centre germinatif et les cellules B mémoires (Brune et al., 2008). L'origine des cellules HRS a été plus complexe à déterminer car elles montrent une perte globale de leur phénotype B et expriment des marqueurs de plusieurs lignées cellulaires hématopoïétiques. Ainsi, elles expriment les marqueurs des lymphocytes T CD3 et CD4, des marqueurs de cellules dendritiques comme la fascine et CCL17, ou encore des marqueurs myéloïdes tels que le récepteur CSF1 et l'alpha1-antitrypsine. Plusieurs arguments vont cependant dans le sens d'une origine lymphoïde B. Par exemple, dans presque tous les cas, les cellules HRS portent des réarrangements et des mutations somatiques dans les gènes des parties variables des immunoglobulines, ce qui indique une origine B (Kuppers et al., 1994). De plus, les lignées cellulaires de LH ont subi une commutation de classe des immunoglobulines, processus qui n'est possible que dans les cellules B activées par un antigène (Irsch et al., 2001). Et enfin, dans les cas de lymphomes multiples, consistant en un LH associé à un lymphome de cellules B matures, les cellules tumorales portent des mutations somatiques identiques, prouvant que ces 2 lymphomes dérivent d'un précurseur commun : une cellule B issue d'un centre germinatif (Brauninger et al., 1999 ; Marafioti et al., 1999).

Plusieurs facteurs sont impliqués dans les changements phénotypiques des cellules HRS. Ce peuvent être des facteurs génétiques, infectieux ou bien encore l'influence du microenvironnement cellulaire.

2. Facteurs génétiques

De nombreux facteurs de transcription spécifiquement exprimés dans les lymphocytes B sont diminués voire inactivés dans les cellules HRS. C'est le cas par exemple du facteur de différenciation EBF1 (early B-cell factor 1) et de PAX5, facteur de maintenance de la lignée B (Hertel *et al.*, 2002). D'autres gènes B sont inactivés par des mécanismes épigénétiques tels que la méthylation de l'ADN (Ushmorov *et al.*, 2006). De fréquentes translocations et/ou réarrangements du gène bcl-6, impliqué dans la régulation de la différenciation des lymphocytes, ont été décrites dans les NLPHL mais pas dans les cHL (Wlodarska *et al.*, 2003).

Une étude de patients hollandais ayant développé un LH s'est intéressée à comparer la fréquence des allèles des gènes HLA et leur association à EBV. Cela a permis de mettre en évidence que HLA-B5 est significativement augmenté et HLA-DR7 significativement diminué dans la population de patients cHL comparé à la population de contrôle sains (Huang *et al.,* 2012). Dans le cas des patients développant un LH associé à EBV, une augmentation spécifique des HLA-DR2 et HLA-DR5 a été décrite, ainsi qu'une augmentation de la fréquence des allèles HLA-A1, HLA-B37 et HLA-DR10, ce qui correspond à un haplotype commun chez les caucasiens, alors que la fréquence de l'allèle HLA-A2 est significativement diminuée. Chez les patients développant un LH non associé à l'EBV a été observée une augmentation significative des HLA-A2, HLA-B7 et HLA-DR2 par rapport à la population contrôle. Cette étude a permis de détecter de nouveaux gènes HLA classe I et II protecteurs ou prédisposants pour le développement d'un LH, en prenant en compte l'association éventuelle à EBV (Huang *et al.,* 2012).

3. Voies de signalisation impliquées

La survie des cellules HRS implique certainement des aberrations génétiques dans les gènes contrôlant l'apoptose et régulant la croissance et la prolifération cellulaire. Les lésions génétiques décrites le plus fréquemment dans les cellules HRS impliquent principalement deux voies de signalisation : JAK-STAT et NF-KB. D'autres voies et facteurs de transcription sont dérégulés dans les cellules HRS : PI3K-Akt, ERK, AP1, et d'autres récepteurs tyrosines kinases. Toutes ces voies de signalisation interagissent et coopèrent dans la pathogenèse du LH (Kuppers, 2009) et sont susceptibles d'être perturbées par LMP1.

3.1. JAK-STAT

L'activation des Janus-kinases induit la phosphorylation de nombreux substrats, cruciale pour la transduction des signaux de cytokines. Le plus important de ces substrats est la famille d'activateurs de transcription STAT, dont il existe 7 membres STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, et chacun est activé par des cytokines particulières (Leonard and O'Shea, 1998).

Dans les cellules HRS, l'expression de JAK2 est souvent augmentée par gain génomique, c'està-dire qu'il y a une augmentation du nombre de copies de son gène se traduisant par une augmentation de la quantité de protéine exprimée (Joos *et al.,* 2000). Au contraire, l'expression de l'inhibiteur de la voie JAK-STAT, SOSC1, est nettement altérée par de nombreuses mutations somatiques dans les cellules HRS (Weniger *et al.,* 2006, Mottok, 2007 #283). IL-4 et IL-13 sont les activateurs principaux de STAT6. La forme phosphorylée de STAT6 est très fréquemment détectée dans le noyau des cellules HRS des cas de LH classiques (78%), mais rarement dans les cellules de l'infiltrat réactionnel (Skinnider *et al.,* 2002). STAT6 est impliqué dans l'expression de chimiokines Th2 comme l'éotaxine, TARC ou encore MDC.

STAT3 a été impliqué dans l'oncogenèse de tumeurs aussi bien solides que lymphoïdes (Bowman *et al.,* 2000). Plusieurs cytokines augmentées dans les LH activent STAT3 comme IL-6 et IL-10. LMP1 et le CD40 peuvent également activer STAT3. La forme phosphorylée de STAT3 a été mise en évidence dans 87% des cas de cellules HRS (Skinnider *et al.,* 2002), mais contrairement à STAT6 une large proportion des cellules de l'infiltrat réactionnel expriment également STAT3 phosphorylée.

STAT5 est activé par plusieurs cytokines dont deux en particulier ont été décrites comme des facteurs de croissance des cellules HRS, IL-2 et IL-9. Cependant, la forme phosphorylée de STAT5 n'a été détectée que dans 26% des cas de cellules HRS (Skinnider *et al.,* 2002).

3.2. NF-кВ

Un des mécanismes majeurs dans la pathogénicité des cellules HRS est l'activation de la voie NF- κ B à la fois par la voie classique, dite canonique, et par la voie alternative, dite non-canonique. Une molécule NF- κ B fonctionnelle est un hétérodimère composé de protéines de la famille Rel (RelA, RelB, c-Rel, p50, p52...). La forme la plus rapidement et couramment induite est le dimère RelA/p50 que l'on appelle par défaut NF- κ B. NF- κ B est maintenu sous une forme inactive dans le cytoplasme par l'inhibiteur I κ B, qui se lie à NF- κ B et masque son signal de localisation nucléaire. Il existe différentes protéines I κ B (I κ B- α , I κ B- β et I κ B- ϵ) régulées différemment et ayant des affinités différentes pour NF- κ B.

Dans la voie d'activation classique, l'activation de différents récepteurs cellulaires comme le CD30, CD40 ou RANK, stimule des facteurs associés au récepteur du TNF (TRAF), qui s'associent avec la protéine RIP. Le complexe kinase inhibiteur de NF-κB (composé de IKKα, IKKβ et NEMO) est ainsi activé et provoque la phosphorylation de IκBα et IκBε. Ces derniers sont alors ubiquitinylés et dégradés par le protéasome, libérant l'hétérodimère NF-κB et permettant sa relocalisation nucléaire. Dans la voie alternative, la stimulation des récepteurs cellulaires mène à l'activation de la kinase NIK, qui active à son tour le complexe IKKα. IKKα activé dégrade le précurseur p100 en une molécule mature p52 qui peut se transloquer dans le noyau en tant qu'hétérodimère p52-RelB (Figure 15). Les voies classique et alternative aboutissent toutes les deux à la relocalisation nucléaire d'hétérodimères NF-κB (p50-p65, p52-RelB), facteurs de transcription activant l'expression de protéine anti-apoptotiques (Figure 15).

La voie NF-κB est activée habituellement par des cytokines ou la présence d'organismes pathogènes. De nombreux facteurs pro-inflammatoires peuvent stimuler NF-κB, ce qui permet la prolifération et la survie des cellules HRS en augmentant l'expression des protéines régulatrices du cycle cellulaire cycline D2, et les protéines anti-apoptotiques comme A1, TRAF1, bcl-xL (Hinz *et al.,* 2001). Au contraire, l'inhibition de NF-κB résulte en l'apoptose des cellules HRS et une diminution du risque de développer un LH (Khan, 2006).

Les facteurs de transcription NF-κB interviennent dans de nombreux processus physiologiques tells que la réponse immune adaptative ou innée, la proliferation cellulaire, la mort cellulaire et l'inflammation. La régulation de NF-κB et tous les mécanismes interférant dans ses voies de signalisation, parmi lesquels LMP1, sont potentiellement impliqués dans le développement et la progression des cancers (Figure 14).



Figure 14 : Gènes cibles de NF-κB impliqués dans le développement et la progression des cancers (d'après Baud and Karin, 2009)

Dans les cellules HRS, la voie de signalisation de NF-ĸB est perturbée à plusieurs niveaux. A un niveau génétique, l'expression de ses régulateurs positifs peut être augmentée. C'est le cas pour le facteur de transcription REL qui est surexprimé dans 50% des LH (Barth *et al.,* 2003). Plus rarement, l'expression de BCL-3, membre de la famille des inhibiteurs de NF-ĸB (=IĸB) régulant positivement l'activité de NF-ĸB, est augmentée par gain génomique (Mathas *et al.,* 2005).

La voie NF- κ B peut également être perturbée par l'intervention de différents partenaires cellulaires. La protéine induite par le TNF- α , TNFAIP3 ou protéine A20, peut inhiber la voie NF- κ B en accélérant la dégradation par le protéasome du complexe TRAF-RIP. Elle est induite par NF- κ B afin d'exercer une boucle de rétrocontrôle négatif. Dans les cellules HRS, le gène de la protéine A20 est fréquemment inactivé par des mutations somatiques. Il est intéressant de noter que la fréquence de ces mutations somatiques est significativement plus élevée dans les cellules HRS non infectées par EBV (70%) par rapport aux cellules HRS EBV+ (12,5%) (Schmitz *et al.,* 2009). D'autres mutations somatiques invalidantes ont été décrites dans les gènes d'inhibiteurs de la voie NF- κ B tels que NFKBIA et NFKBIE.

L'activation de la voie NF-κB implique des membres de la famille des récepteurs au TNF-α (TNFR) : CD30, CD40, TACI, BCMA, RANK. Les ligands de ces TNFR sont produits par les cellules du microenvironnement tumoral et stimulent l'activation de la voie NF-κB des cellules HRS. Par exemple, le ligand du CD40 (CD40L) est exprimé par les cellules T autour des cellules tumorales, le ligand du CD30 (CD30L) par les éosinophiles et mastocytes. La communication avec les cellules HRS (Figure 16). L'EBV est retrouvé dans les cellules HRS dans 40% des cas, dans la population générale non infectée par le VIH et jusqu'à 80-100% des cas chez les personnes VIH+. La protéine de latence membranaire LMP1 mime alors un récepteur CD40 constitutivement actif, induisant l'activation de la voie NF-κB (Kilger *et al.,* 1998) et interférant dans de nombreuses autres voies de signalisations impliquées dans le développement des LH.



Figure 15 : Description de la voie de signalisation NF-κB et de ses perturbations possibles dans les cellules HRS (d'après Kuppers, 2009)

4. Rôle des cytokines dans le développement du LH

4.1. Microenvironnement tumoral

Les cellules HRS ne représentent qu'environ 1% des cellules du tissus tumoral d'un LH. Elles sont entourées de fibroblastes et de cellules du système immunitaire comme des lymphocytes T, des lymphocytes B, des plasmocytes, des neutrophiles, des éosinophiles et des mastocytes. La composition du microenvironnement tumoral en ces différentes cellules a permis la classification des lymphomes de Hodgkin en quatre sous-types différents : cellularité mixte, scléro-nodulaire, déplété en lymphocytes ou riche en lymphocytes. Toutes ces cellules communiquent avec les cellules HRS soit directement, par contact, soit indirectement, par l'intermédiaire de cytokines. Le recrutement de cellules de l'inflammation dans le microenvironnement tumoral est indispensable à la survie des

cellules HRS. Les caractéristiques cliniques et histologiques d'un LH sont dûes aux effets des nombreuses cytokines sécrétées en grande majorité par les cellules HRS elles-mêmes, mais également par les cellules de l'infiltrat réactionnel en réponse à des signaux inflammatoires causés par différents facteurs étiologiques, parmi lesquels l'EBV.

Les lymphocytes T CD4+ sont particulièrement nombreux autour des cellules tumorales et jouent probablement un rôle dans le développement du LH (Figure 16). En effet, l'amélioration des thérapies des patients VIH+ a permis une restauration de leur taux de lymphocytes T CD4+, ce qui a paradoxalement augmenté le risque relatif de développer un LH comparé à l'incidence des autres lymphomes associés au VIH qui a diminué (Biggar *et al.*, 2006).

4.2. Description des cytokines, chémokines

Les cytokines sont un groupe de protéines sécrétées, produites et régulées par les cellules immunitaires. Leur activité biologique est pléiotrope et redondante, c'est-à-dire que chaque cytokine a plusieurs cibles et que plusieurs cytokines peuvent induire la même réponse cellulaire. Leur expression et effet varient en fonction du type cellulaire, de l'environnement cellulaire et de la concentration des autres cytokines. Les cytokines et chémokines sont les effecteurs de la réaction inflammatoire. Elles attirent les leucocytes sur le site des blessures cellulaires, activent les cellules, leur permettent de proliférer et de finaliser les réparations tissulaires. Les cellules HRS sécrètent de nombreuses cytokines afin d'influencer leur environnement et de participer au processus du développement tumoral (survie, prolifération, angiogenèse, métastase, évasion immune). Le mécanisme de régulation principal de la sécrétion des cytokines est la voie NF-KB, décrite comme un promoteur de tumeur dans les cancers associés à une inflammation chronique (Pikarsky *et al.,* 2004).



Figure 16 : Interaction des cellules HRS avec leur micro-environnement tumoral (d'après Kuppers, 2009 ; Khan, 2006)

4.2.1. Cytokines secrétées par les cellules HRS

Toutes les cellules du microenvironnement tumoral sont activement attirées par les cellules HRS. Ces dernières sécrètent des chémokines RANTES/CCL5, CCL17 (ou TARC) et CCL22 afin d'attirer les lymphocytes T helpers et T régulateurs. La sécrétion d'IL-5, CCL-5 et CCL28 attire les éosinophiles dans le microenvironnement tumoral tandis que les mastocytes sont attirés uniquement par RANTES/CCL5 et les neutrophiles par l'IL-8. RANTES/CCL5 a également un effet direct sur la survie et la prolifération des cellules HRS (Aldinucci *et al.,* 2008) (Figure 16). L'IL-6 et IL-7 permettent la croissance des lymphocytes B et T respectivement. Avec la présence de récepteurs de l'IL-6 sur les cellules HRS, IL-6 peut également servir de facteur de croissance autocrine. De même pour l'IL-9. Les cellules HRS expriment également l'IL-13 et son récepteur. IL-13 agit probablement comme un facteur de croissance autocrine, cela est confirmé par le fait que des anticorps neutralisants l'IL-13 inhibent la prolifération cellulaire des cellules HRS (Kapp *et al.,* 1999).

L'IL-10 est exprimée dans 16% des cas de LH, et en bien plus forte proportion dans le cas des LH associés à l'EBV (66%) (Herbst *et al.,* 1996). IL-10 inhibe certaines cytokines de la différenciation en TH1, notamment IL-2. L'inhibition de la prolifération des lymphocytes contribue à une certaine immunosuppression locale et permet aux cellules HRS d'échapper à la réponse immune cellulaire.

Le TNF- α est également secrété par les cellules HRS, mais sa fonction est un peu plus ambiguë. Il peut être pro-tumorigène ou anti-tumorigène selon le type de complexe intracellulaire formé et le signal intracellulaire induit en réponse à la liaison du TNF à son récepteur de surface (Khan, 2006; Skinnider and Mak, 2002). La stimulation des fibroblastes par le TNF- α induit la sécrétion d'eotaxine, chimiokine attirant les éosinophiles sur le site tumoral.

L'IFN-γ est détecté par immunohistochimie dans environ 50% des cas de LH, aussi bien dans les cellules HRS que dans les cellules environnantes. Il stimule les monocytes et macrophages pour qu'ils phagocytent les micro-organismes étrangers. L'IFN-γ promeut également la production de certains facteurs de croissance comme le TGF-β.

D'autres cytokines sont encore secrétées par les cellules HRS, listées avec leur fonction cellulaire dans le tableau 5.

Processus cellulaire	Cytokines impliquées
Inflammation	IL-1, 2, 5, 6, 7, 8, 13, 17, TGF-β, RANTES/CCL5, TNF-α, CCL28,
	CCL17
Croissance et prolifération	IL-6, 7, 9, 13, 17, CD30L
Immunosuppression	IL-10, TGF-β
Inhibition de l'apoptose	CD40L, TNF-a, cFLIP, bcl-XL, TRAF-1/2, c-IAP-1/2, A1
Métastase	CCR7, CXCR4

Tableau 5 : Liste des cytokines impliquées dans le développement des lymphomes de Hodgkin

4.2.2. Cytokines exprimées par les cellules environnantes

Les cellules de l'infiltrat réactionnel sont attirées et activées par les cellules tumorales et secrètent à leur tour de nombreuses cytokines. L'IL-8 permet le recrutement des neutrophiles (par liaison aux récepteurs cellulaires CXCR1 et CXCR2). Les cellules réactives du LH expriment l'IL-12 et CCR4, particulièrement dans les cas des LH associés à l'EBV (Schwaller *et al.,* 1995). IL-12 est importante pour la différenciation en T_{H1} tandis que l'expression de CCR4 contribue à une réponse de type T_{H2} .

Le TGF- β est produit par les lymphocytes T, les cellules HRS et les éosinophiles. C'est une cytokine anti-inflammatoire bloquant la régulation de l'IL-2R et inhibant la prolifération des lymphocytes T. Il inhibe également l'activité des NK, et lymphocytes B pour augmenter

l'immunosuppression. TGF- β induit la prolifération des fibroblastes et la synthèse de collagène, expliquant la présence de fibrose observée régulièrement dans le sous-type scléro-nodulaire des LH.

Les cytokines jouent un rôle extrêmement important dans la réaction inflammatoire précédant le développement des LH. Elles sont un mode de communication entre les cellules HRS et l'infiltrat cellulaire entourant la tumeur. Ce croisement chimique, utilisé habituellement pour la chiomioattraction de cellules immunes sur les sites d'inflammation, est nécessaire à la survie et à la prolifération des cellules HRS, et est impliqué également dans le développement des métastases, l'angiogenèse et la régulation immune des cellules HRS.

4.3. Rôle des cytokines dans la prolifération et la survie des cellules HRS

Les cellules HRS dérivent de lymphocytes B du centre germinatif qui, habituellement, expriment des immunoglobulines avec une haute affinité pour les cellules dendritiques et reçoivent des signaux de survie. Les cellules HRS ont perdu leur capacité à exprimer ces immunoglobulines, elles seraient donc normalement destinées à mourir si elles ne recevaient pas d'autres signaux de survie leur permettant d'échapper à l'apoptose.

La prolifération et la survie des cellules HRS sont stimulées par une activation anormale de la voie NF- κ B, due à des mutations somatiques du gène IKBA, inhibiteur de la voie NF- κ B, et à l'activation des TNFR, comme le CD40, par leurs ligands. Les cellules HRS produisent de l'IL-4 et d'autres cytokines qui activent la sécrétion de CD40L par les lymphocytes TH2 alentour. L'activation de la voie NF- κ B par le CD40 est transitoire, car l'expression du CD40L par les lymphocytes environnants est rapidement contrôlée et arrêtée. En revanche, la protéine virale LMP1 permet une activation constitutive de la voie NF- κ B dans les cellules HRS, en l'absence totale de ligand ou de stimulation externe. La sécrétion autocrine de TNF- α et l'activation du CD30 par les éosinophiles et mastocytes sécrétant du CD30L sont d'autres activateurs potentiels de la voie NF- κ B et participant à la survie des cellules HRS (Skinnider and Mak, 2002). L'IL-13 et son récepteur cellulaire IL-13R α 1 sont également très fréquemment exprimés dans les cellules HRS, l'IL-13 agit comme un facteur de croissance et de survie autocrine.

4.4. Rôle des cytokines dans l'immunité cellulaire

Les cellules HRS influencent leur microenvironnement afin d'échapper au système immunitaire. Elles attirent des lymphocytes T CD4+ sur le site tumoral et favorisent leur différenciation en T régulateurs. Il semblerait qu'une grande quantité de lymphocytes T régulateurs dans la tumeur soit un marqueur de bon pronostic (Alvaro *et al.*, 2005), les T régulateurs ont donc

certainement une activité immunomodulatrice sur les cellules HRS ou sur les cellules environnantes, favorisant leur survie et leur prolifération.

Les patients développant un LH ont souvent une réponse immune cellulaire défectueuse (Slivnick *et al.,* 1990) alors que leur réponse immune humorale est encore bien fonctionnelle, voire hyperactive. Les cellules HRS modulent leur environnement cellulaire en déplaçant la réponse cellulaire T_{H1} vers une réponse humorale T_{H2} , plus souvent favorable au développement des tumeurs (Tan and Coussens, 2007). Les cellules HRS produisent également des cytokines immunosuppressives afin d'inhiber les fonctions des lymphocytes T effecteurs environnants, comme l'IL-10 ou le TGF- β .

L'IL-2Ra soluble pourrait également jouer un rôle dans la diminution de l'immunité cellulaire. En effet, il est produit par les cellules HRS et est détecté dans la majorité des sérums de patients développant un LH, la présence d'IL-2Ra correspondant fortement avec le stade de la maladie, la charge tumorale et un mauvais pronostic (Ambrosetti *et al.,* 1993). Le sérum de patients LH contenant de l'IL-2Ra a un pouvoir immunosuppresseur sur des lymphocytes normaux en culture, en inhibant la prolifération des lymphocytes T induite par un mitogène (Damle *et al.,* 1992).

5. Rôle des agents infectieux : implication d'EBV

5.1. Preuve de l'implication d'EBV dans le développement des LH

Dans la population générale des pays occidentaux, le virus d'Epstein-Barr est détecté dans les cellules HRS dans environ 20-30% des cas et jusqu'à 90% des cas dans les pays en voie de développement (Dolcetti and Boiocchi, 1998; Flavell and Murray, 2000; Kuppers, 2009). La présence d'EBV dans la tumeur est confirmée par une technique d'hybridation ou de southern blot, qui permettent la détection de l'ADN viral, complétée par le marquage immunohistochimique des protéines virales EBER et LMP1 (Figure 17).



Figure 17 : Double marquage histologique de cellules HRS anti-EBER (brun-noir) et anti-LMP1 (rouge) (Flavell *et al.*, 2000)

Etant donné qu'environ 60% des lymphomes de Hodgkin se développent en l'absence d'EBV dans les pays occidentaux, le rôle d'EBV dans la pathogenèse du LH a été longtemps sujet à controverse. Cependant, un faisceau d'arguments sérologiques, biologiques et fonctionnels permet aujourd'hui d'impliquer clairement EBV dans la pathogenèse du LH. Premièrement, une analyse de la longueur des répétitions terminales (TR) du génome d'EBV a permis de confirmer la clonalité des cellules infectées et de montrer que l'infection par EBV a lieu avant l'expansion clonale de la tumeur (Boiocchi et al., 1993a). Par ailleurs, des cellules semblables aux cellules HRS ont été observées dans des cas de mononucléose infectieuse (Isaacson *et al.,* 1992). Ainsi, les patients avec des antécédents de mononucléose infectieuse auraient un risque de 2 à 5 fois plus élevé de développer un LH (Rosdahl *et al.,* 1974).

Il a été décrit que les patients développant un LH ont des titres en anticorps anti-EBV plus élevés que la population générale au moment du diagnostic (Levine *et al.,* 1971). Une équipe française a précisé que le titre en anticorps anti-VCA des patients ayant un LH est corrélé à la charge virale EBV dans les PBMC (Besson *et al.,* 2006). Parallèlement, une étude a montré qu'une bonne réponse au traitement du LH est associée à une baisse significative de la charge virale EBV. Dans cette même étude, un patient a eu une ré-augmentation de sa charge virale EBV juste avant une rechute. Ainsi, les auteurs suggèrent que la mesure de la charge virale EBV pourrait avoir un intérêt dans le suivi et le pronostic des patients LH+EBV+ (Spacek *et al.,* 2011). En effet, la présence d'ADN viral dans le plasma d'un patient, détectée au moment du diagnostic ou six mois plus tard, serait associée à une moindre survie sans rechute, et donc à un moins bon pronostic (Kanakry *et al.,* 2013).

Un autre argument démontrant l'implication fonctionnelle d'EBV dans le développement du LH est l'observation que le nombre de récepteurs tyrosine-kinases est fortement plus bas dans les cellules HRS EBV+ par rapport aux cellules HRS EBV-. Cela indique qu'EBV, certainement par l'intermédiaire de l'expression de ses protéines virales de latence, est capable de remplacer l'effet pathogène des récepteurs tyrosine-kinases (Renne *et al.,* 2007). De la même manière, le nombre de mutations somatiques invalidantes dans le gène TNFAIP3 est significativement plus faible dans les cellules HRS EBV+ qu'EBV-, suggérant des fonctions complémentaires de l'inactivation de TNFAIP3 et de l'infection par EBV dans la pathogenèse du LH (Schmitz *et al.,* 2009). Tout cela met bien en évidence qu'EBV joue un rôle actif dans le développement du LH.

5.2. Modifications histologiques dûes à l'EBV

Les cellules HRS infectées par l'EBV ont un profil de latence de type II, c'est-à-dire qu'elles expriment les trois protéines virales de latence EBNA1, LMP1 et LMP2A, ainsi que les ARN non codant BARTs et EBERs, détectables par immunohistochimie (Dolcetti and Boiocchi, 1998). Le facteur de transcription ZEBRA/BZLF1 a été décrit dans quelques cas dans le noyau de cellules HRS, mais n'est pas associé à l'expression de protéines tardives du cycle lytique d'EBV comme VCA et EA. L'activation du cycle réplicatif dans les cellules HRS n'aboutit pas à la production de particules virales (Brousset *et al.,* 1993).

EBV est plus souvent associé aux cas de LH à cellularité mixte (jusqu'à 80%) qu'aux autres sous-types (Dolcetti and Boiocchi, 1998 ; Flavell and Murray, 2000 ; Murray et al., 1992). De plus, une corrélation entre EBV et site de la maladie a été démontrée. En effet, pour les patients avec un stade I de LH, la présence d'EBV est corrélée à une présentation dans les ganglions lymphatiques du cou (O'Grady *et al.*, 1994). Ces aires ganglionnaires drainent les amygdales et tissus oropharyngés, principaux sites de prolifération après l'infection par EBV.

5.3. Rôle d'EBV et de LMP1 dans le développement des lymphomes de Hodgkin

L'oncogénicité de la protéine membranaire LMP1 a déjà été largement décrite dans le chapitre « LMP1 ». Cependant, il est intéressant d'apporter quelques précisions sur le rôle particulier d'EBV et de LMP1 dans le développement du LH. En effet, l'expression de LMP1 dans des cellules B du centre germinatif induit des changements transcriptionnels caractéristiques des lignées cellulaires dérivées de LH (Vockerodt *et al.*, 2008). LMP1 induit dans les lymphocytes B de nombreux changements phénotypiques, diminuant l'expression des gènes spécifiques des lymphocytes B et augmentant le nombre de molécules d'adhésion comme ICAM et LFA-3, des marqueurs d'activation des lymphocytes B CD23, CD30, CD40 et CD71 et des gènes anti-apoptotiques comme bcl-2. Par ailleurs, LMP1 interagit avec des protéines du cytosquelette, comme la vimentine, et pourrait ainsi contribuer au changement de morphologie des cellules HRS (Dolcetti and Boiocchi, 1998). Toutes les cibles de LMP1 sont des protéines impliquées dans la croissance cellulaire, la différenciation, la structure cellulaire et l'invasion. LMP1 a donc très probablement un rôle dans la promotion de la transformation cellulaire et le développement des LH. LMP1 intervient également activement dans la communication des cellules HRS avec leur environnement en induisant des changements d'expression de cytokines.

En effet, l'EBV induit l'expression de cytokines immunomodulatrices. Par exemple, LMP1 induit la production d'IL-10, qui empêche la prolifération des lymphocytes T servant à contrôler

l'infection par l'EBV chez les individus sains et favorise la prolifération des lymphocytes B (Nakagomi *et al.,* 1994). De plus, LMP1 augmente la sécrétion d'IL-12 par les cellules environnantes des cellules HRS, cytokine impliquée dans la différenciation des lymphocytes T en Th1 (Schwaller *et al.,* 1995; Yoshimoto *et al.,* 1998). LMP1 induit aussi la production d'IL-6 et IL-8 en activant la voie NF-κB et les MAP-kinases (Eliopoulos *et al.,* 1999). L'IL-6 stimule la prolifération des LCL et la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes, promouvant la sécrétion d'anticorps. Dans les cellules HRS, elle peut également avoir un rôle de facteur de croissance autocrine. L'IL-8 est une chémokine dont la fonction principale est de recruter les éosinophiles et d'attirer les lymphocytes T cytotoxiques. Cependant, elle a également été décrite dans des mélanomes, augmentant la croissance des cellules et favorisant l'angiogenèse et leur potentiel métastatique (Huang *et al.,* 2002). Il est possible que l'IL-8 contribue de la même manière au développement des tumeurs associées à l'EBV.

EBV persiste à long terme chez les hôtes infectés en établissant un équilibre entre sa propre survie et celle des cellules-hôtes. Par exemple, LMP1 augmente l'expression d'ICAM-1, permettant l'adhésion entre eux des LCL transformés afin de concentrer l'effet des facteurs de croissance et des cytokines sécrétées par ces cellules. Parallèlement, ICAM-1 augmente également l'adhésion entre les LCL et les lymphocytes T, ce qui favorise la reconnaissance et la destruction des cellules transformées. L'IL-10 induite par LMP1 antagonise l'activité de l'IL-12 qui promeut les réponses immunes cellulaires, tandis qu'en même temps EBV augmente le niveau d'IL-12. De plus, les protéines de latence membranaires LMP1 et LMP2 présentes dans la plupart des tumeurs associées à EBV représentent des épitopes potentiels reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques. Les pathologies associées à l'EBV n'apparaissent que lorsque l'homéostasie entre EBV et le système immunitaire est rompue à cause d'une déficience immune ou lorsque des altérations génétiques s'accumulent et font pencher la balance du côté de la prolifération incontrôlée des cellules infectées (Mosialos, 2001).

III. Lymphome de Hodgkin et VIH

1. Epidémiologie

Depuis 1996, l'utilisation des multithérapies combinant plusieurs familles thérapeutiques d'antirétroviraux a permis de restaurer le système immunitaire des personnes vivant avec le VIH. Cela a eu pour conséquence directe de diminuer le risque de survenue d'infections opportunistes et de ralentir l'évolution de la maladie VIH. L'incidence globale des lymphomes associés au VIH, et particulièrement des lymphomes non hodgkiniens, a également diminué. Elle est estimée actuellement, d'après la Base de Données Hospitalière Française sur l'Infection à VIH, à 120-140 cas par an en France. En revanche, l'incidence des lymphomes de Hodgkin (représentant 30 % de l'ensemble des lymphomes associés au VIH) a augmenté au cours des dernières années (Herida *et al.,* 2003). En France, leur nombre est actuellement estimé à 50 cas par an et le risque par rapport à la population générale de développer un LH est augmenté d'un facteur 20 pour les personnes séropositives VIH. Les causes de cette augmentation ne sont pas connues et suscitent encore des interrogations chez les chercheurs et les cliniciens.

Powles et son équipe (2009) ont calculé l'incidence des cancers dans une étude prospective anglaise de 11 112 personnes VIH+ avec un suivi de 71 687 patients/année. L'incidence des lymphomes de Hodgkin est plus élevée chez les personnes VIH+ que dans la population générale VIH-, avec un ratio d'incidence standardisé (RIS) de 13,85 (intervalle de confiance à 95% (IC) : 9,64-19,26). Il est intéressant d'observer que ce ratio a augmenté sur les différentes périodes de l'étude : 4,5 de 1983 à 1995, 11,1 de 1996 à 2001, 32,4 de 2002 à 2007. Récemment, une étude italienne portant sur 5085 patients VIH+ avec un suivi de 30946 personnes/année, confirme que l'incidence des LH est plus importante chez les patients VIH+ que dans la population générale VIH- (RIS=21.8 ; IC 95% 15,33-31) et souligne que le risque de développer un LH est plus important dans les six premiers mois après le début du traitement antirétroviral (Gotti et al., 2013). En effet, le traitement par multithérapie antirétrovirale est associé à un plus haut risque de développer un LH (RIS 2,67 ; IC 1,19-6,2). Cet effet pourrait être dû en particulier aux inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse (risque relatif instantané ou Hazard Ratio (HR) 2,20 ; IC 1,03-4,69) (Powles et al., 2009). Une étude française précise que le risque relatif de développer un LH ne serait pas lié à l'utilisation des multithérapies antirétrovirales mais plutôt au délai après l'initiation du traitement. Le risque serait significativement plus élevé dans les 3 mois après le début du traitement par multithérapie antirétrovirale (risque relatif 2,95 ; IC 1,64-5,31), période où le taux de CD4 réaugmente mais est encore faible. La charge virale VIH n'aurait pas d'influence sur le risque de développer un LH (Lanoy et al., 2011).
La plupart des pathologies associées au SIDA se développent lors des phases d'immunosuppression sévères, un taux de lymphocytes CD4 bas (<500/mm³) étant le facteur de risque le plus prédictif (Guiguet *et al.,* 2009). Cependant, l'incidence des lymphomes de Hodgkin semble plus faible chez les personnes ayant une immunodépression sévère (CD4+ < 50/mm³), que chez les personnes présentant une immunodépression moins profonde (CD4+ compris entre 150-199/mm³) (Biggar *et al.,* 2006). Cela suggère que le développement d'un LH requiert la présence d'un minimum de cellules immunitaires, qui communiquent avec les cellules tumorales de Reed-Sternberg et participent à leur croissance et leur survie. Paradoxalement, en permettant une restauration du système immunitaire des patients VIH+, les multithérapies sont également associées à une augmentation du risque de développer un LH.

2. Particularités des LH/VIH+

2.1 Clinique

Les lymphomes de Hodgkin dans la population VIH+ présentent quelques particularités par rapport à ceux de la population générale. Tout d'abord la présentation clinique au diagnostic est plus agressive, généralement à un stade plus avancé. 74 à 92% des cas sont à un stade III ou IV au diagnostic, d'après la classification d'Ann Harbor, avec une présence de sites extra-nodaux et une infiltration fréquente de la moelle osseuse (40-50% des cas). Les symptômes « B » (fièvre, sueur nocture, perte de poids supérieure à 10% du poids normal) sont également plus fréquents chez les patients LH/VIH+ (fréquence 70-100%) que dans la population générale de patients développant un LH (Dolcetti et al., 2001; Vaccher *et al.*, 2001).

2.2. Histologique

Dans la population générale VIH-, les sous-types les plus fréquemment retrouvés sont la forme scléro-nodulaire et la forme à cellularité mixte du LH classique. Tandis que dans la population VIH+, les sous-types histologiques les plus fréquemment retrouvés sont des LH classiques avec les sous-types à cellularité mixte ou déplétion lymphocytaire, particulièrement dans les cas de patients avec une immunodépression sévère. Les patients VIH+ traités par multithérapie antirétrovirale et ayant une immunosuppression modeste sont plus à risque de développer un LH scléro-nodulaire. Les formes de LH à prédominance lymphocytaire nodulaire (NLPHD) sont très rares chez les patients VIH+ comparé à la population générale (Biggar *et al.,* 2006).

La composition de l'environnement cellulaire autour des cellules HRS est également différente. Dans les LH/VIH+, il y a présence caractéristique d'une prolifération de cellules stromales fibrohistiocytoïdes et une inversion du ratio des lymphocytes T CD4+/CD8+ (Dolcetti *et al.,* 2001). Cela reflète la déplétion générale en lymphocytes T CD4+ chez ces patients. Le tissu tumoral présente une déplétion sévère des CD4+ « helpers », au profit des CD8+ « suppresseurs » qui ne sont pas capables de générer une réponse immune durable.

2.3. Moléculaire

L'expression du CD40L par les cellules T entourant les cellules HRS est très importante. La majorité de ces cellules expriment le CD40, appartenant à la superfamille des récepteurs au TNF- α et impliqué dans la croissance et la différenciation cellulaire, afin d'interagir avec les lymphocytes T actifs présents dans le microenvironnement cellulaire. Dans la majorité des cas de LH/VIH+, le ratio de CD4+/CD8+ est inversé et les lymphocytes T entourant les cellules HRS n'expriment que très rarement le CD40L. Cette voie de communication CD40/CD40L est donc affaiblie ou interrompue, certainement compensée par la présence d'autres récepteurs au TNF- α ou encore de la protéine virale LMP1 (Dolcetti *et al.,* 2001).

2.4. Traitement et pronostic

Le traitement d'un LH chez un patient VIH+ est basé sur le protocole ABVD. Les patients VIH+ sont souvent exclus des essais cliniques de traitement du LH, leur pronostic moins bon pouvant biaiser les résultats de l'étude. En effet, ils sont généralement à un stade plus avancé au diagnostic et on craint une toxicité accrue du traitement à cause des interactions médicamenteuses éventuelles entre les antirétroviraux et la chimiothérapie. Pourtant, à ce sujet, l'étude de Kaplan montre qu'il serait possible d'utiliser les mêmes lignes de traitement pour les patients VIH+ ou VIH-, avec un pronostic de rémission complète identique pour ces deux populations (Kaplan *et al.*, 2012). Les patients VIH+ peuvent également recevoir des greffes de cellules souches autologues avec une bonne tolérance et une très bonne efficacité (Diez-Martin *et al.*, 2009) et des essais de greffes allogéniques sont en cours.

Le pronostic de survie des patients LH/VIH+ s'est nettement amélioré depuis l'utilisation des multithérapies. Une étude rétrospective de l'utilisation du protocole ABVD avec la multithérapie antirétrovirale chez des patients LH+/VIH+ à des stades avancés a montré un taux de rémission complète de 87% avec une survie générale à 5 ans de 76% (Xicoy *et al.,* 2007). Ces chiffres sont comparables à ceux des patients LH+/VIH-.

69

3. Rôle du VIH

Peu d'études mettent en évidence un rôle direct du VIH dans la pathogenèse des lymphomes. Dans des modèles cellulaires de lymphome de Burkitt, il a été montré que la protéine du VIH Tat interfère dans le contrôle du cycle cellulaire en interagissant avec la protéine RB2/p130 (Lazzi *et al.,* 2002). Tat est également capable d'intervenir dans les processus de signalisation cellulaires, impliquant des kinases telles que PKR, ERK et p38, afin de moduler l'expression des cytokines par les cellules infectées et les cellules environnantes, notamment l'IL-10 (Li *et al.,* 2005).

La contribution du VIH à la pathogenèse des lymphomes est principalement indirecte. L'augmentation du risque de lymphome chez les patients VIH+ est reliée à de nombreux facteurs : la durée et le degré d'immunosuppression, l'induction de cytokines pro-prolifératives et les possibles co-infections par des virus oncogènes EBV ou HHV-8. De manière générale, les pathologies associées au VIH sont dûes à une diminution de la surveillance immune contre les virus et les cellules tumorales infectées par les virus. L'hyperactivation immune peut également jouer un rôle dans le développement des lymphomes B. En effet, une réplication virale continue et incontrôlée conduit à une activation chronique des lymphocytes T et leur prolifération, les cellules naïves T sont donc activées, prolifèrent et finissent par mourir d'apoptose, cela épuise le pool de cellules T naïves, diminuant la capacité la réponse-spécifique antigénique (Ribeiro *et al.*, 2002).

La lignée cellulaire B-HIV1, dérivée de lymphocytes B humains transformés par infection par le VIH-1, contient les deux génomes d'EBV et VIH. Dans cette lignée cellulaire, l'oncogène c-myc est exprimé à un niveau 10 à 20 fois supérieur à celui des lymphocytes B normaux. L'expression des gènes d'EBV est également augmentée, notamment celle de LMP1. L'activation d'EBV par le VIH pourrait contribuer aux manifestations cliniques de lymphadénopathies très tôt après l'infection par le VIH (Astrin and Laurence, 1992).

4. Association à l'EBV

Dans les pays occidentaux, l'EBV est impliqué dans le développement d'environ 40% des LH/VIH-. Dans la population LH/VIH+, le taux d'association à l'EBV va jusqu'à 80-100% des cas. La très haute fréquence et la clonalité d'EBV dans les LH, même détecté dans plusieurs lésions indépendantes, suggère qu'il pourrait être un des facteurs étiologiques des LH, particulièrement pour les LH/VIH+. Ceci est renforcé par l'expression de LMP1 dans tous les cas de LH/VIH+ (Spina *et al.,* 2011). Une approche *in situ* permet de montrer que les ARN non codant EBER sont exprimés en grand nombre dans les cellules HRS infectées par EBV (Herndier *et al.,* 1993 ; Tirelli *et al.,* 1995). Comme pour les cas de LH non associés au VIH, l'analyse de l'ADN viral a montré la présence d'épisomes clonaux dans les cellules HRS, l'infection a donc bien lieu avant l'expansion clonale des

cellules HRS. De plus, un même clone cellulaire infecté par EBV a été retrouvé et persiste dans différents sites de la maladie chez le même patient (Boiocchi et al., 1993b). Ces résultats sont clairement en faveur d'un rôle fonctionnel des clones infectés par EBV et supporte l'hypothèse d'une implication d'EBV dans la pathogenèse des LH associés au VIH.

Le groupe français d'étude de l'EBV (ANRS-AC11) a pu montrer que, chez des patients VIH+, les charges virales EBV sanguine et plasmatique corrèlent positivement avec la charge virale VIH et tendent à corréler négativement avec le taux de lymphocytes CD4+ (Amiel *et al.*, 2009).

Les deux sous-types EBV1 et EBV2 sont capables d'induire des LH de la même manière. On retrouve cependant plus de sous-types 2 d'EBV dans le cas de LH associés au VIH (50%) que dans les cas VIH- (0-44%) (Dolcetti *et al.,* 2001).

Il semblerait que chez les sujets infectés par le VIH et développant un LH, le variant LMP1del30 soit détecté en grande majorité. En effet, des études en Espagne et en Italie ont montré que cette délétion se retrouvait dans 80 à 100% des cas dans les cellules HRS des patients LH/VIH+, tandis que dans la population adulte LH/VIH-, cette délétion n'est observée que dans 30% à 40% des cas (Dolcetti et al., 2001; Guidoboni et al., 2005; Santon and Bellas, 2001) (tableau 6). Cette délétion de 30pb apparaîtrait au cours de la réplication virale par des recombinaisons homologues entre des séquences dupliquées qui entourent la région à déléter (Sandvej *et al.,* 1994) et pourrait donc être favorisée par l'augmentation de la réplication virale de l'EBV que l'on constate au cours de l'infection VIH. LMP1-del30 présente un pouvoir tumorigène accru (Hu *et al.,* 1993) et une immunogénicité diminuée (Trivedi *et al.,* 1994), mais son rôle exact dans le développement de LH/VIH+ reste à déterminer.

Tableau 6: Récapitulatif des études portant sur la détection d'EBV chez les patients VIH+ développant un LH. (Dolcetti et al., 1997; Santon and Bellas, 2001; Santon et al., 1995; Zuercher et al., 2012)

Pays	Pathologie	Statut VIH	Prélèvement	Détection d'EBV par PCR	Fréquence du variant LMP1-del30	Fréquence du variant LMP1- WT
Italie	LH	VIH+	biopsie	12/13 (92%)	10/12 (83,3%)	2/12 (16,7%)
	LH	VIH-	biopsie	30/35 (85,7%)	12/30 (40%)	18/30 (60%)
	LNH	VIH+	biopsie	7/7 (100%)	4/7 (57%)	3/7 (43%)
	LNH	VIH-	biopsie	5/5 (100%)	2/5 (40%)	3/5 (60%)
	population contrôle	VIH+	PBMC	37/39 (95%)	16/37 (43%)	17/37 (46%)
	population contrôle	VIH-	PBMC	18/85 (21,1%)	9/18 (50%)	8/18 (44%)
Espagne	LH	VIH+	biopsie	10/11 (90,9%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)
	LH	VIH-	biopsie	21/25 (84%)	6/21 (28,6%)	14/21 (66%)
Suisse	LH	VIH+	sang total	41/42 (97,6%)		
	LH	VIH+	biopsie	15/16 (93,7%)		
	population contrôle	VIH+	sang total	85/90 (94,4%)		

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

Depuis les années 90, l'utilisation des traitements antirétroviraux a permis le maintien ou la restauration du système immunitaire chez les personnes séropositives VIH+ et l'incidence des lymphomes non Hodgkiniens associés au VIH a globalement diminué. En revanche, de façon surprenante, l'incidence des lymphomes de Hodgkin (LH) progresse toujours (Herida et al., 2003). Une des caractéristiques des LH associés au VIH (LH/VIH+) est la présence quasi constante du génome de l'EBV dans la cellule tumorale de Hodgkin et Reed-Sternberg (HRS) : entre 80 et 100 % des cas contre seulement 40 % des cas chez les patients non VIH (Hamilton-Dutoit et al., 1993). Les cellules HRS infectées par l'EBV expriment des protéines virales définissant une latence de type II, notamment la protéine de latence membranaire LMP1, décrite comme étant l'oncogène majeur de I'EBV (Young and Rickinson, 2004). LMP1 agit comme un récepteur au TNF constitutivement actif et intervient dans la signalisation cellulaire afin de favoriser la croissance, la prolifération et la survie cellulaires. Plusieurs études, in vitro et chez l'animal, décrivent des variants de LMP1, raccourcis de 10 ou 23 acides aminés, ayant un pouvoir tumorigène accru et une moindre immunogénicité (Hu et al., 1993; Trivedi et al., 1994). De plus, des études italiennes et espagnoles montrent que le variant plus court de 10 acides aminés serait présent au niveau de la tumeur chez 80-100% des patients LH/VIH+ contre seulement 10-40% des patients ayant un LH non associé au VIH.

Au niveau du tissu tumoral, les cellules HRS ne représentent qu'environ 1% des cellules. La communication avec les cellules environnantes, notamment les cellules immunitaires, par l'intermédiaire des cytokines est donc capitale pour leur survie. LMP1 intervient dans de nombreuses voies cellulaires et est capable de moduler l'expression de nombreuses cytokines, favorisant la prolifération cellulaire et instaurant un microenvironnement propice au développement tumoral. Cependant, aucune étude n'a jamais été réalisée dans le contexte particulier du LH et l'effet des différents variants de LMP1 sauvage ou délétés n'a jamais été caractérisé.

L'objectif de mon travail est d'étudier l'implication de LMP1 dans le développement du LH chez les sujets VIH+ et de réaliser une étude fonctionnelle des variants de LMP1 dans un modèle *in vitro* de cellules dérivées de LH. Nous pourrons ainsi mettre en évidence si les variants délétés de LMP1 peuvent être considérés comme des facteurs de risque favorisant la survenue des LH et déterminer au niveau cellulaire s'il existe des différences fonctionnelles entre les variants sauvage et délétés de LMP1. J'ai développé un modèle *in vitro* de cellules dérivées d'un LH, les KMH2, exprimant la protéine LMP1 sauvage ou ses variants délétés de façon inductible, dans le but de mieux comprendre comment les variants de LMP1 favoriseraient l'apparition d'un LH. L'étude du cycle cellulaire et de l'expression des cytokines nous a permis de mettre en évidence des différences de comportement entre les lignées cellulaires exprimant les différents variants de LMP1, expliquant en partie les propriétés oncogènes de chacun de ces variants (Sueur *et al.*, 2013, soumis à Virology).

De plus, j'ai recherché la présence de LMP1 dans les cellules oropharyngées et le sang total de patients infectés par le VIH et diagnostiqués pour un LH, issus de la cohorte Lymphovir (CO-16, ANRS). Cette cohorte est coordonnée par le Dr Caroline Besson et financée par l'ANRS. Les populations contrôles sont soit des personnes ayant développé un LH, soit étant infectées par le VIH. Une technique de séquençage nouvelle génération nous a permis de détecter les différents variants de LMP1 présents dans chaque échantillon clinique, avec une très bonne sensibilité, et de comparer la fréquence des ces variants dans les différents compartiments biologiques et entre les différentes populations.

Partie I

Etude fonctionnelle *in vitro* de cellules de Hodgkin infectées par EBV présentant une protéine LMP1 sauvage ou délétée dans son domaine C-terminal

Mon travail de thèse a porté sur l'étude des variants de LMP1, sauvage ou délétés dans la partie C-terminale, dans le développement du LH chez les sujets VIH+. La première partie de ma thèse a consisté à développer un modèle cellulaire d'étude *in vitro* du LH, afin d'étudier l'impact de LMP1 et de ses différents variants au niveau cellulaire. J'ai tout d'abord recréé et introduit dans différents vecteurs les délétions de 30 et 69pb dans le gène *BNLF1*. Puis j'ai établi différentes lignées cellulaires KMH2, cellules dérivées d'un LH, infectées ou transfectées de façon stable par le bacmide maxi-EBV-GFP, contenant le génome entier de la souche B95-8 d'EBV, ou par le plasmide pRT-LMP1, permettant l'expression inductible de LMP1.

MATERIELS ET METHODES

I. Biologie cellulaire

1. Culture cellulaire

Les 293-HEK (cellules épithéliales embryonnaires de rein humaines) sont cultivées en milieu DMEM avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF), de la pénicilline-streptomycine (100UI/mL) et de l'ofloxacine (1µg/mL). Les KMH2 (lignée cellulaire dérivée d'un LH) sont cultivées en milieu RPMI avec 10% de SVF, de la pénicilline-streptomycine (100UI/mL) et de l'ofloxacine (1µg/mL). Toutes les cellules sont cultivées à 37°C, dans une atmosphère contenant 5% de CO2.

2. Etablissement des 293-HEK-EBV-GFP

Des cellules 293-HEK sont cultivées en plaque 6 puits et transfectées avec le bacmide p2089-EBV-GFP à raison de 4µg d'ADN pour 10µl de lipofectamine (Invitrogène). Quatre heures après la transfection le milieu est aspiré et remplacé par du DMEM frais. Le lendemain, les cellules sont trypsinées et réensemancées dans une BP₁₀₀. Lorsqu'elles atteignent 50% de confluence, 200µg/ml d'hygromycine sont ajoutés dans le milieu afin de sélectionner uniquement les cellules transfectées par le bacmide. Arrivées à confluence, les cellules sont trypsinées et clonées en plaque 96puits dans du DMEM contenant 20% de SVF, de la pénicilline-streptomycine et 200µg/ml d'hygromycine. Des clones ont émergé après environ 2 à 3 semaines de culture.

3. Production de particules virales infectieuses

Les 293-HEK-EBV-GFP sont transfectées par le facteur de transcription ZEBRA afin d'induire le cycle lytique d'EBV et la production de particules virales. Après 72h, le surnageant de culture contenant les particules virales est collecté, filtré à 0,45µm et concentré par centrifugation sur un gradient de sucrose. Le surnageant concentré en particules virales ainsi obtenu est utilisé pour infecter les KMH2. Ces étapes ont été effectuées par Henri Gruffat, à l'ENS Lyon, comme décrit précédemment (Gruffat *et al.,* 2011).

4. Cytométrie de flux

Pour la mesure du nombre de cellules exprimant la GFP, 5.10⁵ cellules sont simplement fixées à la PFA 4% et analysées par cytométrie de flux, comparées à des cellules non infectées. Le marquage du récepteur CD21 est réalisé sur cellules vivantes, sur la glace. Les cellules sont saturées 30 min dans 100µl de RPMI contenant 10% de NHP (normal human plasma, fourni par l'EFS de Grenoble) et 3% de BSA puis incubées 30 min avec l'anticorps monoclonal anti-CD21 (clone IOB1, Immunotech CO, Marseille France) ou un anticorps contrôle isotypique. Après 2 rinçages au RPMI/NHP 2%, les cellules sont incubées 30 min avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à un fluorochrome alexa-488, rincées une nouvelle fois à deux reprises et finalement fixée à la PFA 4% avant l'analyse par cytométrie de flux. Les mesures de cytométrie ont été réalisées à l'IBS (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) sur un FACScan (Becton Dickinson) et analysées avec le logiciel CellQuest.

II. Biologie moléculaire

1. Mutagenèse par PCR chevauchante

Le vecteur p2167 nous a été fourni par le Pr Hammerschmidt (Munich). Il contient une partie du génome d'EBV, dont le gène *BNLF1* codant pour LMP1 (Figure 18). Afin de recréer les délétions de 30 et 69 nucléotides dans LMP1 (en position 1190-1229 et 1161-1229 du gène *BNLF1*), nous avons utilisé une technique de PCR chevauchante. Cela consiste dans un premier temps à amplifier par PCR

les deux fragments encadrant la zone à déléter, puis à les réassembler lors d'une deuxième étape de PCR (Figure 19a). Les amorces externes 1 et 4 sont choisies de manière à contenir un site de restriction unique sur le vecteur, ici Nhel et Bst1107I. Les amorces internes 2 et 3 encadrent au nucléotide près la zone à déléter. Une séquence complémentaire à l'amorce 3 est rajoutée en 5' sur l'amorce 2. Cette zone de chevauchement sur les amorces 2 et 3 permet aux fragments d'ADN de s'hybrider lors de la deuxième étape de PCR, l'assemblage (Figure 19b).



Figure 18 : Cartographie simplifiée du plasmide p2167. Les sites de restriction sont indiqués en bleu et en rouge (position des sites de restriction sur le plasmide : EcoRV : 2670, Acll : 8335 - 12902 - 13276, Nhel : 6077, Bst1107I : 7703)

La première étape d'amplification consiste en deux PCR réalisées en parallèle avec les couples d'amorce 1-2 (=PCR1) et 3-4 (=PCR2) sur 50ng de plasmide p2167 avec une polymérase haute fidélité (Phusion, ThermoScientific) et un cycle de 30sec à 95°C, 30sec à 55°C, 2min à 72°C. Chaque PCR est réalisée en double, l'une subissant 10 cycles, l'autre 24 cycles afin de vérifier par migration sur gel d'agarose la qualité du produit de PCR (environ 600nt pour la PCR1 et 1000nt pour la PCR2). Les produits de PCR ne subissant que 10 cycles sont purifiés sur colonne (Nucléospin, Macherey-Nagel), élués dans 15µl et quantifiés par Nanodrop (Thermo Scientific).

Lors de la deuxième étape d'assemblage, les produits des PCR1 et PCR2 purifiés sont mélangés de façon équimolaire et soumis à une seconde PCR avec un cycle identique. Les dix premiers cycles de PCR se font en l'absence d'amorce. Les produits de PCR1 et PCR2 s'hybrident au niveau de leur séquence spécifique et la polymérase complète les fragments ainsi assemblés. Vingt cycles de PCR sont ensuite réalisés en présence des amorces externes 1 et 4. Le produit de PCR final est purifié sur colonne, quantifié par nanodrop et sa qualité et son intégrité sont vérifiées par migration sur gel d'agarose. Il correspond à l'insert, comprenant la délétion de 30 ou 69nt, qui doit être réintroduit dans le vecteur p2167 (Figure 19a).



Figure 19 : Principe de la mutagenèse par PCR chevauchante. (a) deux étapes de PCR permettent d'amplifier séparément deux fragments d'ADN encadrant la zone à déléter puis de les réassembler en un plus grand insert qui sera cloné dans le vecteur initial (b) description des amorces utilisées pour la PCR chevauchante

2. Clonage

Digestion : 1µg de l'insert obtenu lors de la PCR chevauchante et du vecteur p2167 sont digérés par les enzymes de restriction Nhel puis Bst1107I 1h à 37°C (Fermentas). Les enzymes sont ensuite inactivées 20min à 80°C. L'insert est purifié sur colonne Nucléospin et quantifié. Le vecteur est purifié par migration et extraction sur gel d'agarose (QIAEX II, Qiagen) et quantifié. Afin d'éviter qu'il ne se recircularise sans l'insert lors de l'étape de ligation, il est déphosphorylé par une phosphatase alcaline 30min à 37°C, inactivée par la suite 20min à 65°C.

<u>Ligation</u> : L'insert et le vecteur sont mélangés avec un ratio de 1:1 ou 3:1 en présence d'ATP et de T4 DNA ligase (Roche) 30min à température ambiante, avec une quantité totale d'ADN de 100ng dans un volume final de 20µl. Un contrôle est réalisé, en parallèle, avec le plasmide digéré déphosphorylé sans insert. Cela permet d'évaluer l'efficacité de la ligation et la spécificité de la transformation bactérienne.

<u>Transformation</u>: 1µl du produit de ligation est ajouté à 25µl de bactéries thermocompétantes (NEB-5α, Biolabs), décongelées préalablement 10min dans de la glace. Le mélange est laissé 30min sur la glace avant d'appliquer un choc thermique à 42°C pendant 30sec. Après 5min sur la glace, le mélange est repris dans 250µl de milieu SOC, laissé sous agitation 1h à 37°C, étalé sur une boite de LB-agar contenant de l'ampicilline et incubé à 37°C toute une nuit. Afin de vérifier la présence de l'insert dans le plasmide p2167, plusieurs clones sont testés en culture liquide dont l'ADN est extrait (Miniprep, QIAGEN). L'ADN subit une double digestion Nhel-Bst1407I et est migré sur gel d'agarose. La présence de la délétion de 30nt ou 69nt dans le gène BNLF1 est finalement confirmée par séquençage (Beckman Coulter Genomics).

3. Recombinaison homologue

Une fois les délétions de 30nt ou 69nt créées dans le plasmide p2167, le but est de les transférer dans le bacmide p2089 ou maxi-EBV-GFP, fourni par le Pr Hammerschmidt, contenant l'ensemble du génome de la souche B95-8 d'EBV ainsi que le gène codant pour la GFP (Figure 20). Etant donné la taille du bacmide, 173kb, l'approche classique de clonage par digestion et ligation n'est pas envisageable. Nous avons procédé par recombinaison homologue (Figure 21).



Figure 20 : Description du bacmide maxi-EBV-GFP, p2089. Ce bacmide de 173kb contient le génome entier de la souche B95-8 d'EBV. Le gène codant pour la GFP permet de répérerer par microscopie à fluorescence ou cytométrie de flux les cellules contenant le bacmide. Un gène de résistance au chloramphénicol pour permet la production de ce bacmide en bactéries et un gène de résistance à l'hygromycine permet sa sélection en cellules eukaryotes.

Quarante microgrammes du plasmide p2167 sont digérés par EcoRV dans un volume final de 115µl pendant 7h à 37°C. L'ADN est purifié par précipitation à l'éthanol en présence d'acétate de sodium 0,3M, puis repris dans de l'eau stérile afin d'être digéré par Acll dans un volume final de 115µl sur la nuit à 37°C. Cette digestion coupe p2167 en 4 fragments de 5666, 4567, 3058 et 378pb. L'ADN est migré sur un gel d'agarose à 1% et le fragment de 5666pb est extrait du gel et purifié (QIAEX II, Qiagen). Ce fragment contient le gène BNLF1 entier, avec les délétions de 30pb ou 69pb, ainsi qu'une cassette de résistance à la kanamycine. 300ng du fragment d'ADN sont électroporés à 2,4kV dans 50µl de bactéries électrocompétantes contenant le bacmide maxi-EBV-GFP et le plasmide pKD46 codant pour la recombinase Lambda-Red. Les bactéries sont mises en culture dans du milieu SOC 30min à 37°C puis 30min à 42°C afin d'effectuer la recombinaison homologue entre le bacmide et le fragment de 5666pb puis ensemancées sur boite de LB-agar contenant du chloramphénicol et de la kanamycine et incubées sur la nuit à 39°C. La spécificité des colonies ayant poussé est vérifiée par ensemencement de quelques clones sur trois boites de LB-agar contenant soit de la kanamycine, soit du chloramphénicol, soit de l'ampicilline. Les clones poussant sur ampicilline sont éliminés car le bacmide ne possède pas de résistance à l'ampicilline, ces clones sont donc des clones résistants à tous les antibiotiques et ne possèdent pas forcément le bacmide. Un clone spécifiquement résistant au chloramphénicol et à la kanamycine est mis en préculture dans 10ml de LB contenant du chloramphénicol et de la kanamycine puis dilué dans une culture de 100ml du même milieu, cultivé à 37°C jusqu'à obtenir une DO de 0,6. Les bactéries sont centrifugées 15min à 4500rpm à 4°C puis lavées trois fois avec 20ml d'eau afin de les rendre électrocompétantes. Un dernier lavage est réalisé avec de l'eau contenant 10% de glycérol, puis les bactéries sont finalement reprises dans 250µl d'eau avec 10% de glycérol. Elles sont électroporées avec le plasmide pCP20, codant pour la recombinase Flp et possédant deux gènes de résistance au chloramphénicol et à l'ampicilline, puis cultivées 1h dans 500µl de milieu SOC à 30°C. Les bactéries sont ensuites étalées sur boite de LB-agar contenant du chloramphénicol et de l'ampicilline et incubées sur la nuit à 30°C. Une colonie est mise en culture dans 3ml de LB contenant du chloramphénicol pendant 4h à 42°C. A cette température, la recombinase Flp est exprimée et enlève le gène de résistance à la kanamycine du bacmide par recombinaison homologue entre deux zones encadrant le gène. Les bactéries sont alors ensemancées sur des boites LB-agar chloramphénicol sur la nuit à 42°C. Les colonies ayant poussé sont repiquées sur trois boites de LB-agar contenant soit du chloramphénicol, soit de l'ampicilline, soit de la kanamycine une nuit à 37°C et elles ne doivent plus pousser sur la boite contenant de la kanamycine.

Les clones ainsi obtenus sont mis en culture afin d'extraire et de purifier le bacmide (NucléoBond Xtra EF, Macherey-Nagel). L'intégrité du bacmide est vérifiée par migration sur gel d'agarose après digestion d'1µg d'ADN par BamHI, et la présence des délétions del30 et del69 est contrôlée par PCR et séquençage.



Figure 21 : Principe de la recombinaison homologue dans le bacmide p2089. Cam^R : gène de résistance au chloramphénicol, Kan^R : gène de résistance à la kanamycine

4. Extraction d'ADN

Afin de vérifier la présence des plasmides dans les différentes lignées cellulaires établies, l'ADN est extrait de 1.10⁶ cellules avec le DNA extraction kit (Qiagen) selon le même protocole que décrit dans les matériels et méthodes de la partie II. Les PCR sont ensuite réalisées sur 200ng d'ADN total.

5. RT-PCR

extraction d'ARN : 5 à 10 millions de cellules, fraichement culottées ou conservées à -80°C, sont reprises dans 1ml de TRI-Reagent (euromedex), transférées dans un tube eppendorf et incubées à température ambiante 5min. 200µl de chloroforme sont ajoutés, vortexés, incubés 15min à température ambiante puis centrifugés à 13000rpm 15min à 4°C afin de séparer les phases aqueuse (phase supérieure, contenant l'ARN) et organique (phase inférieure, contenant l'ADN et les protéines). La phase aqueuse (environ 600µl) est transférée dans un nouveau tube eppendorf et l'ARN est précipité par l'isopropanol (70% du volume de phase aqueuse, soit environ 420µl) incubé 10min à température ambiante avec 100µg de glycogène puis centrifugé 8min à 13000rpm à 4°C. Le surnageant est enlevé délicatement avec une pipette. L'ARN est ensuite rincé avec 500µl d'éthanol 70% puis centrifugé à 13000rpm 5min à 4°C. L'éthanol est enlevé délicatement et l'ARN est laissé à sécher à l'air libre pendant 5-10min. L'ARN est finalement redissout dans 40µl d'eau sans RNase, quantifié au nanodrop et 1µg est migré sur un gel d'agarose 1% afin de d'en vérifier la qualité.

<u>traitement à la DNase</u> : 10µg d'ARN total sont traités par 0,5µl de DNase (Turbo DNase, Ambion), dans un volume final de 20µl, 30min à 37°C. Puis la DNase est inactivée par 2µl de l'agent inactivateur 2min à température ambiante. Après une centrifugation 30sec à 13000rpm le surnageant est récupéré, conservé à -80°C avec 1µl d'inhibiteur de RNase (SUPERase-In Ambion).

rétrotranscription : 1µg d'ARN est rétrotranscrit en ADN complémentaire (cDNA) avec la SuperScript III conformément aux instructions du laboratoire (Invitrogène), dans un volume total de 20µl. La PCR sera réalisée sur 1µl de ce cDNA.

6. PCR

Les PCR sont réalisées sur 1µl de cDNA ou 200ng d'ADN total, avec 1unité de Taq polymérase (Euromedex) dans un volume total de 25µl, en présence du tampon approprié contenant du MgCl2, de 0,5µl de dNTP à 10mM et 0,5µl de chacune des amorces sens et anti-sens à 10pmol/µl. Après une première étape de dénaturation 5min à 94°C, 30 cycles sont appliqués de 30sec à 94°C, 30sec à 58°C et 30sec à 72°C avant une dernière étape finale d'élongation de 5min à 72°C. Les produits de PCR obtenus sont migrés sur gel d'agarose 1,5% et visualisés par du BET. Les amorces sens et anti-sens utilisées sont récapitulées dans le tableau 7.

gène ciblé	amorce sens	amorce anti-sens	longueur attendue du produit de PCR
EBNA1	5'-CCGCAGATGACCCAGGAGAA-3'	5'-TGGAAACCAGGGAGGCAAAT-3'	520pb
EBER1	5'-AGGACCTACGCTGCCCTAG-3'	5'-AAAACATGCGGACCACCAGC-3'	167pb
EBNA2	5'-GGATGAAGACTAAGTCACAGG-3'	5'-TGACGGGTTTCCAAGACTATCC-3'	615pb
BMRF1	5'-CCAGACATACGGTCAGTCCATCTC-3	5'-TGCTTCACTTTCTTGGGGTGC-3'	210pb
gp350	5'-TGTGCTGATAGAGGCTGGTG-3'	5'-TGACACCAAGTCCATCTCCA-3'	673pb
LMP1	5'-CCTCATAGCCCTAGCGACTC-3'	5'-GTCGTCATCATCTCCACCGG-3'	206pb
LMP2a	5'-TTTTGCAGTCGCTGCTGCAG-3'	5'-TACAGATAGATGGCACTCTT-3'	400pb
ZEBRA	5'-CAACAGACTAACCAAG-3'	5'-GGCTTGGGCACATCTGC-3'	571pb
β-actine1	5'-CGTGATGGTGGGCATGGG-3'	5'-CTGGGTCATCTTCTCGCG-3'	230pb

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour les PCR EBV

RESULTATS

I. Etablissement d'une lignée cellulaire de lymphome de Hodgkin EBV-positive

1. Choix du modèle cellulaire

Il existe peu de lignées cellulaires dérivées d'un LH (9 sur la base allemande de collection de lignées cellulaires DMSZ), parmi elles une seule est EBV-positive, la lignée L-591. Une seule autre lignée possède le récepteur d'entrée à EBV, le CD21, mais est EBV-négative : la lignée KMH2. C'est cette lignée cellulaire que nous avons choisie pour établir notre modèle Hodgkinien d'infection par EBV. En effet, la transfection de cellules lymphoïdes par des réactifs de transfection classiques tels que la lipofectamine ou par électroporation est peu efficace et très toxique pour ces cellules. A plus forte raison encore avec un bacmide de la taille du maxi-EBV-GFP, mesurant 173kb. Afin d'établir des lignées cellulaires dérivées de Hodgkin EBV positives, la méthode la plus appropriée est donc l'infection par des particules virales d'EBV, nécessitant la présence du récepteur d'entrée CD21 sur les cellules (Figure 22).



Figure 22 : Expression du CD21 sur les KMH2. Histogramme représentant un nombre de cellules dénombrées en cytométrie de flux en fonction de leur intensité de fluorescence Alexa488. L'aire violette représente l'intensité de fluorescence de base des KMH2 sans marquage, la courbe verte représente les KMH2 avec un marquage non spécifique par un anticorps isotypique de l'anticorps anti-CD21, et la courbe rose représente les KMH2 avec un marquage spécifique anti-CD21.

La plupart des études concernant LMP1 ont été réalisées en transfectant LMP1 de façon stable ou transitoire dans des lignées cellulaires, très peu d'équipes ont travaillé avec le génome entier d'EBV. Deux équipes ont établi des lignées cellulaires KMH2 infectées avec la souche Akata d'EBV, mais LMP1 n'est pas exprimé dans ces lignées (Baumforth *et al.*, 2005; Kis *et al.*, 2005). Afin d'étudier l'implication d'EBV et particulièrement des variants de LMP1 dans le développement du LH, nous avons donc choisi de mettre au point un modèle cellulaire de LH, les KMH2, infectées avec la souche B95-8 d'EBV possédant un gène LMP1 sauvage ou délété de 30pb ou 69pb. Les délétions dans le gène LMP1 ont été créées par PCR chevauchante et introduites dans le bacmide p2089 par recombinaison homologue. Ceci est décrit dans la partie biologie moléculaire des matériels et méthodes.

2. Etablissement d'une lignée KMH2-EBV

Dans un premier temps, le bacmide p2089 ou maxi-EBV-GFP est transfecté dans des cellules épithéliales 293-HEK, moins fragiles et facilement transfectables par un bacmide de 200kb. Grâce à un gène de résistance à l'hygromycine présent sur le bacmide, il est possible de sélectionner les cellules contenant le bacmide et de les cloner afin d'obtenir une lignée stable 293-HEK-EBV (Figure 23). Ceci a été réalisé avec le bacmide maxi-EBV-GFP codant pour le gène LMP1 sauvage, ainsi qu'avec les bacmides codant pour le gène LMP1 délété de 30pb ou 69pb, conduisant à l'obtention de trois lignées cellulaires 293-HEK-EBV-LMP1-WT, 293-HEK-EBV-LMP1-del30 et 293-HEK-EBV-LMP1-del69.



Figure 23 : 293-HEK stablement transfectées par le bacmide maxi-EBV-GFP. La présence du bacmide dans les cellules est vérifiée par observation de l'expression de la GFP par microscopie à fluorescence. (a) GFP (b) marquage des noyaux par le Hoechst (c) superposition de la GFP et du Hoechst.

Le cycle lytique a été activé dans la lignée stable 293-HEK-EBV-LMP1-WT par transfection du facteur de transcription ZEBRA, induisant la production et la libération dans le surnageant de culture de particules virales d'EBV. Le surnageant de culture est ensuite collecté et concentré en particules virales. Les KMH2 ont finalement été mises en culture dans ce surnageant et infectées par les particules virales d'EBV. L'efficacité d'infection des KMH2 peut être déterminée en quantifiant par cytométrie de flux le nombre de cellules exprimant la GFP. Quelques jours après l'infection, environ

15-20% des KMH2 exprimaient la GFP. De l'hygromycine a alors été ajoutée dans le milieu de culture afin de sélectionner les cellules contenant le bacmide, permettant d'obtenir une lignée cellulaire KMH2-EBV-LMP1-WT avec 80% de cellules exprimant la GFP (Figure 24a). La présence du bacmide dans les KMH2-EBV a également été contrôlée par extraction d'ADN suivie d'une PCR EBNA1 (Figure 24b).



Figure 24 : Contrôle des KMH2-EBV. (a) Mesure du nombre de cellules exprimant la GFP par cytométrie de flux. En violet sont représentées des KMH2 non infectées, en vert les KMH2-EBV. (b) PCR EBNA1 sur l'ADN extrait de KMH2-EBV.

3. Caractérisation des KMH2-EBV

Afin de caractériser l'état de latence de notre lignée cellulaire, l'ARN des KMH2-EBV a été extrait et des RT-PCR réalisées pour détecter des gènes viraux exprimés à différents stades de l'infection par EBV. Nous avons pu vérifier que, comme attendu dans une latence de type II, EBNA1, LMP1 et les EBER sont bien exprimés par les KMH2-EBV. En revanche, LMP2a, autre protéine habituellement exprimée lors de la latence de type II, n'est pas exprimée. Nous avons vérifié que les KMH2-EBV n'expriment pas le facteur de transcription très précoce ZEBRA, ni la glycoprotéine d'enveloppe gp350, protéine exprimée tardivement lors du cycle réplicatif. Mais par ailleurs, les cellules montrent une expression d'EBNA2, qui n'est exprimé normalement que dans la latence de type III, et de BMRF1 qui est le facteur de processivité de l'ADN polymérase exprimé lors de la réplication virale (Figure 25). La lignée cellulaire KMH2-EBV ne montre pas un profil d'expression de protéines virales correspondant à une latence de type II. Elle ne représente donc pas le meilleur modèle cellulaire de cellules dérivées de LH, qui, infectées par EBV *in vivo*, présentent une latence de type II.

Cette lignée KMH2-EBV a été obtenue avec des particules virales produites par la lignée 293-HEK-EBV-LMP1-WT. Etant donné qu'elle ne montre pas le bon profil de latence, nous n'avons pas poursuivit l'établissement de KMH2-EBV infectées avec des particules virales possédant le gène LMP1 délété de 30 ou 69pb.



Figure 25 : Caractérisation du profil de latence des KMH2-EBV-GFP-LMP1-WT. L'expression des gènes viraux est étudiée par RT-PCR dans les KMH2-EBV, avec pour contrôle des KMH2 non infectées. La qualité de l'extraction d'ARN et de la reverse-transcription sont controlées par la PCR actine.

Une équipe suédoise a établi auparavant une lignée cellulaire de KMH2 infectées *in vitro* par la souche EBV Akata (Kis *et al.*, 2005). Contrairement à notre lignée cellulaire, ces cellules exprimaient les EBER, EBNA1 et LMP2a, mais pas LMP1. L'expression de LMP1 était induite par des agents chimiques comme le butyrate de sodium ou d'autres inhibiteurs de l'histone-desacétylase, ou par un stimulus physiologique comme le traitement avec du CD40L et de l'IL-4. Cette observation les a amené à suggérer que l'expression de LMP1 ne serait pas constitutive dans les cellules en latence de type II, mais serait en fait une conséquence de la stimulation par les cytokines du milieu environnant (CD40L et IL-4 dans les LH, IL-10 dans les lymphomes de Burkitt induit l'expression de LMP1) (Kis *et al.*, 2006).

II. Etablissement de lignées cellulaires KMH2 exprimant LMP1 de façon inductible

1. Présentation de l'article

Afin d'obtenir un modèle cellulaire de LH exprimant uniquement des protéines virales correspondant à une latence de type II, nous avons établi des lignées cellulaires stablement transfectées avec le plasmide pRT-LMP1, fourni par le Pr Jean Feuillard (Université de Limoges). Ce plasmide comporte le gène codant pour EBNA1 sous contrôle d'un promoteur constitutivement actif et le gène codant pour LMP1 sous contrôle d'un promoteur activé par la doxycycline. EBNA1 et LMP1 étant les deux protéines virales principales exprimées lors d'une latence de type II, ce modèle est plus représentatif d'un LH associé à l'EBV que les KMH2-EBV établies précédemment. La création des plasmides pRT-LMP1-WT, pRT-LMP1-del30 et pRT-LMP1-del69 ainsi que l'établissement des lignées cellulaires est décrite dans les matériels et méthodes de l'article.

Dans le tissu tumoral, les cellules HRS sont entourées par de nombreuses cellules du système immunitaire avec lesquelles elles communiquent par l'intermédiaire des cytokines et chémokines, participant au processus de développement tumoral : prolifération et survie cellulaire, échappement au système immunitaire, formation de métastases... De nombreuses voies de régulation de la sécrétion des cytokines sont influencées par LMP1, la principale étant la voie NF-KB. Nous avons étudié l'impact de l'expression des différents variants de LMP1 sur l'expression des cytokines et la progression du cycle cellulaire afin de mieux comprendre le rôle d'EBV dans le développement du LH et de mettre en évidence si l'un des variants de LMP1 montre un comportement plus oncogène que les autres.

2. Article

Sueur et al. 2013, soumis à Virology

DIFFERENCE IN CYTOKINE PRODUCTION AND CELL CYCLE PROGRESSION INDUCED BY EPSTEIN-BARR VIRUS LMP1 DELETION VARIANTS IN KMH2, A HODGKIN LYMPHOMA CELL LINE: IMPLICATIONS FOR TUMOR DEVELOPMENT

Sueur C.¹²³⁴, Lupo J.¹²³⁴, Mas P.³⁵, Morand P.¹²³⁴, Boyer V.¹²³⁶

¹ Univ. Grenoble Alpes, UVHCI, F-38000 Grenoble, France

² CNRS, UVHCI, F-38000 Grenoble, France

³ Unit for Virus Host-Cell Interactions, Univ. Grenoble Alpes-EMBL-CNRS, 6 rue Jules Horowitz, 38042 France.

⁴ CHU de Grenoble, BP217, 38043 Grenoble Cedex 9, France

⁵ EMBL Grenoble Outstation, F-38000 Grenoble, France

⁶ UMR 912 SESSTIM, 23 rue S. Torrents, 13006 Marseille, France

Key words : EBV, variant, Hodgkin, cytokine, cell cycle

ABSTRACT

Epstein-Barr latent membrane protein LMP1 is a well known oncogenic protein. The two C-terminal deletion variants del30-LMP1 and del69-LMP1 have been described to be more tumorigenic in animal models. This work aims to detail the implication of LMP1 in the development of Hodgkin's lymphoma (HL) and to characterize the particular effects of these variants. In the KMH2 cell line, all LMP1 proteins induced the expression of several pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , TNF- β , IL-6, RANTES/CCL5 and IFN- γ . However, the del30-LMP1 variant induced cytokine expression at a lower level than the other variants, while the del69-LMP1 variant stimulated greater cytokine expression. In addition, we measured that LMP1 greatly impacted the cell cycle progression. Wild-type LMP1 and del30-LMP1 respectively induced an accumulation of cells in the G2/M or G0/G1 phase of the cell cycle. These differences observed between the LMP1 variants reflect their own oncogenic properties, thus impacting the development of tumors.

INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is an ubiquitous tumor-causing virus infecting more than 90% of human adults worldwide with a life-long infection in B lymphocytes asymptomatically (Rickinson, 2007). EBV causes infectious mononucleosis and is associated with several human malignancies, among them nasopharyngeal carcinoma (NPC), Burkitt's lymphoma and Hodgkin's lymphoma (HL) (Young and Rickinson, 2004). EBV infection is mostly non-lytic (except in infectious mononucleosis) and results in the expression of a limited number of nuclear and membrane proteins. EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) is a multifunctional oncoprotein essential for EBV-induced B-cell proliferation and transformation in vitro (Kaye, Izumi, and Kieff, 1993). LMP1 shares several features with CD40, a member of the tumor necrosis factor receptor family (TNFR). LMP1 activates the transcription factor nuclear factor-κB (NF-κB) by promoting turnover of IκBα, an important inhibitor of NF-kB, conferring the cells a protection against apoptosis. A direct link between LMP1 and cell cycle progression has also been shown in several studies although they were essentially focused on NPC cells or Burkitt lymphoma cell lines (Deng et al., 2012; Lo et al., 2004; Guo et al., 2012; Floettmann et al., 1996). In the EBV-associated pathologies, different variants of LMP1 have been described. For example, a 30-bp deletion variant at the C terminal and corresponding to the CAO variant isolated from a NPC patient, was found to have increased potential to transform rodent fibroblasts and to induce tumors in nude mice when compared to wild-type LMP1 (Hu et al., 1993). A 69-bp deletion LMP1 variant has also been described in NPC (Hadhri-Guiga et al., 2006) and other lymphoproliferative disorders such as HL (Knecht et al., 1993). These deletions do not interfere with the stimulation of NF-κB (Rothenberger et al., 1997). However, the presence of such variants associated to the pathogenesis of several diseases leads to the hypothesis that polymorphisms within LMP1 gene might influence the susceptibility to develop EBV-associated tumors.

Hodgkin Lymphoma (HL) is a B cell lymphoma, characterized by a minority of neoplastic cells, the Hodgkin and Reed-Sternberg cells (HRS cells), and an extensive inflammatory background. Classical HRS cells derive from post-germinal center B cells, destined for apoptosis in the B cell selection process because of the lack of successful immunoglobulin gene rearrangement. In Western world, 30-40% of HL are associated with EBV while in South America it reaches 70% (Jarrett, 2002). EBV type II latency program is present in HL, characterized by the expression of LMP1 and two other viral proteins, EBNA1 and LMP2 in addition to small RNAs, termed EBER 1 and 2 (Young and Murray, 2003). EBV can replace the survival signals that are normally provided by the B-cell receptor during germinal center reaction, thereby circumventing the normal apoptotic pathway (Caldwell *et al.*, 1998). Interestingly, EBV has been detected in 80-100% of HL arising in HIV patients, supporting the notion that this virus plays a pivotal role in the pathogenesis of this tumor. Moreover, presence of the 30-bp deletion has been frequently associated with the HL disease in HIV infected individuals (Dolcetti et al., 2001; Spina et al., 2011). Concomitantly, many studies have documented that HL is associated with disturbed cytokine production (Gruss et al., 1997). Cytokine and chemokine production may not only promote growth of HRS cells and help to evade immune surveillance, but they also cause the characteristic histology and the clinical symptoms of HL (Skinnider and Mak, 2002). Cross-talk between HRS cells and surrounding lymphocytes has been studied for many years, and this interaction appeared to play an important for the pathogenesis of HL. Few studies have documented the impact of EBV infection on HL development. HL derived cell lines have been either infected by EBV in vitro (Baumforth et al., 2005; Diehl et al., 1982; Kis et al., 2005; Knecht et al., 1996) or transiently transfected by a constitutive expressed LMP1 vector. However, results obtained with these tools were difficult to interpret since the cell lines either did not express LMP1 until a membrane signal was applied (CD40 ligand and IL4) or they lead to morphological studies showing an association of LMP1 with the formation of multinuclear cells. Other studies on LMP1 genetic diversity from samples derived from HL patients focusing mainly on LMP1 variant origin and activation of the NF-κB pathway were also conducted (Faumont et al., 2009; Faumont et al., 2004; Zuercher et al., 2012). However, the impact of the LMP1 polymorphism on the HL cells has not been documented.

In this study, we investigated whether LMP1 variants could modulate cytokine expression and cell cycle progression in KMH2 – a HL derived cell line – to analyze the LMP1 polymorphism in a Hodgkin environment.

MATERIALS AND METHODS

Plasmid constructs

We performed an overlapping PCR using the p2167 plasmid (kindly provided by W. Hammerschidt, Munich, Germany), in order to create the 30-bp and 69-bp deletions in the BNLF1 gene coding for LMP1 (Higuchi, Krummel, and Saiki, 1988). The p2167 plasmid contains 9.5kb of the EBV genome, as described (Dirmeier *et al.*, 2003). Two DNA fragments surrounding the deletions (respectively in position 1190-1229 and 1161-1229) were amplified by PCR with a high fidelity polymerase (Pfu, Promega). The following primers were used,

P1: 5'-CGTGCTGCTAGCTCTTAGTTTCTGGGTGTG-3';

P2a: 5'-GCCCGCCTTTGATGACAGACGGAGGCGGCGGTGATCCACACCTTC-3';

P2b: 5'-CAATTGACGGAAGAGGTTGAAAACAAAGGAGGTGATCCACACCTTCCTACGC-3';

P3a: 5'-TCCGTCTGTCATCAAAGGCGGGC-3';

P3b: 5'-TCCTTTGTTTTCAACCTCTTCCGTCAATTG-3';

P4: 5'-GCCCTTTGTATACTCCTACTGATGAGTAAGTATTACACCC-3'.

First, two PCRs were performed with 50ng of the p2167 plasmid in a total volume of 50µl, with primers P1+P2a and P3a +P4 for the 30-bp deletion or P1+P2b and P3b+P4 for the 69-bp deletion. After 5min of denaturation at 95°C, 10 cycles of 30sec at 95°C, 30sec at 55°C and 2min at 72°C were carried out, followed by an elongation step for 5min at 72°C. PCR products were purified by QIAEX purification kit (Qiagen, Hilden, Germany), quantified by the nanodrop system (Labtech, Uckfield, United-Kingdom) and equimolarly mixed to be submitted to a second PCR. After 10 cycles with the same program but without primers, allowing the first two PCR products to hybridize, external primers P1 and P4 were added for another 20 cycles. The final 1.6kb PCR product containing the 30-bp or 69-bp deletion was reintroduced into the original p2167 plasmid in the Nhel and Bst11071 restriction sites and subcloned into the Sfi-I sites of the pRT-LMP1 vector (kindly provided by J. Feuillard, Limoges, France) with the In-Fusion HD cloning kit (Clontech, Mountain View, CA, USA). This vector contains the EBNA1 gene under the control of a constitutively activated promoter and a bidirectional tetracyclin-inducible promoter driving the expression of NGFRt and LMP1 (Le Clorennec *et al.*, 2008). The pcDNA-WT-LMP1 plasmid is a kind gift from F. Grässer (Hambourg, Germany).

Cell culture, transfection and induction

293-HEK cells (human embryonic kidney cell line) were cultured in DMEM supplemented with heat inactivated fetal bovine serum 10% and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin and 1µg/ml

ofloxacin). KMH2 cells (EBV-negative Hodgkin Lymphoma-derived cell line obtained from DSMZ, Braunschweig, Germany) were cultured in RPMI supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum and antibiotics (100 units/ml penicillin/streptomycin, 1µg/ml ofloxacin), at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. For transient transfection of pcDNA-WT-LMP1 in 293-HEK cells, 5.10⁵ cells were plated in a 35-mm petri dish and transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) in the ratio of 10µl transfection reagent for 4µg of DNA, following the manufacturer's instructions. Establishment of KMH2 cell lines stably transfected with the three pRT-LMP1 plasmids (pRT-WT-LMP1, pRT-del30-LMP1 and pRT-del69-LMP1) was performed with the Amaxa electroporation system (Amaxa, Cologne, Germany), according to the manufacturer's instructions. Five millions KMH2 cells were electroporated with 5µg of DNA, using the Nucleofactor kit-T (Amaxa, Cologne, Germany) and the T-001 program. Cells were then resuspended in 5 ml of fresh RPMI with 20% FBS, supplemented with 1X non-essential amino-acids, 10mM Hepes and 1mM sodium pyruvate. Hygromycin (Sigma) was introduced in the medium 48h after the transfection at 200µg/ml. After three weeks of selection, LMP1 expression was assessed by flow cytometry after inducing the cells with 1µg/ml doxycyclin (Clontech) for 24h, as described elsewhere (Le Clorennec *et al.,* 2008).

Western-Blotting

Five millions KMH2-pRT-LMP1 cells were grown in presence or not of doxycyclin for 24h. Cells were lysed in a buffer composed of 50mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol and protease inhibitors. Lysates were sonicated and total proteins were quantified with BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA) according to the manufacturer's instructions. Fifty micrograms of total proteins were separated on a 9% SDS-PAGE gel, transferred on a PVDF membrane and revealed by western-blot analysis with an anti-LMP1 antibody (monoclonal CS.1-4, Dako, Glostrup, Denmark, 1:100) and a rabbit polyclonal anti-actin (Sigma, St Louis, MO, USA; 1:400). Secondary HRP-conjugated anti-mouse (1:20000), anti-rabbit antibodies (1:10000) were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). The signal was developed by Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce).

RNA extraction and RT-PCR

Total RNA was extracted from 5.10⁶ KMH2-pRT-LMP1 cells with TRI-Reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France), quantified with a nanodrop ND1000 instrument system (Labtech) and treated with Turbo-DNase (Ambion, Austin, TX, USA). cDNA was synthesized from 1µg total RNA with random hexamers, using the superscript III (Invitrogen) in a total volume of 20µl. PCRs were then

performed on 1µl of cDNA, with 0.25U of the Phusion polymerase (Thermo-Scientific, Waltham, MA, USA) in the provided buffer, in presence of 200µM dNTP and 200µM of specific primers. Primer sequences are : LMP1-forward, 5'-CCTCATAGCCCTAGCGACTC-3' ; LMP1-reverse, 5'-GTCGTCATCATCTCCACCGG-3' ; EBNA1-forward, 5'-CCGCAGATGACCCAGGAGAA-3' ; EBNA1-reverse, 5'-TGGAAACCAGGGAGGCAAAT-3' ; β -actin-forward, 5'-CGTGATGGTGGGCATGGG-3' β -actin-reverse, 5'-CTGGGTCATCTTCTCGCG-3'. After a denaturation step of 3min at 94°C, the following cycle was applied to the samples : 30sec at 94°C, 30sec at 60°C (for EBNA1, T_H was 56°C), 30sec at 72°C, repeated 26 times for the actin amplification and 30 times for LMP1 and EBNA1 amplifications. A final elongation step was performed for 5min at 72°C. PCR products were migrated on a 2% agarose gel in 1X TAE buffer and visualized with ethidium bromide staining (Invitrogen).

LMP1 staining and intracellular cytokine detection

KMH2 cells were either treated by doxycyclin $(1\mu g/ml)$ to induce LMP1 expression or stimulated with 50 ng/ml PMA (Sigma) and 1μ g/ml ionomycin (Sigma) to be used as positive control for cytokine expression during 24h. Throughout the last 4h of doxycyclin or PMA-ionomycin induction, cells were treated with 10µg/ml brefeldin A (BioLegend) and 2µM monensin (Sigma) to block secretion of cytokines. Cells were collected and fixed with Fixation Buffer (BioLegend) for 20min at room temperature. Cells were then permeabilized by two centrifugations (for 8min at 350g) with permeabilization wash buffer (BioLegend). If LMP1 staining is needed, doxycyclin-induced cells were saturated for 30min in 100µl RPMI containing 10% human plasma (kindly provided by EFS Rhône-Alpes, Grenoble, France) and 0.1% triton X-100, incubated for 30min with the anti-LMP1 antibody (1:100) and washed twice with 5ml of RPMI. Cells were then incubated for 30min with an Alexa A488 or A594-conjugated anti-mouse antibody (Invitrogen, 1:2500) and washed twice with 5ml of RPMI. Saturation of the anti-mouse secondary antibody free Fab sites was performed with a mouse hybridoma supernatant (clone D3210, kindly provided by E. Drouet, UVHCI, Grenoble, France). For intracellular cytokine staining, cells were then resuspended in 100µl of permeabilization wash buffer, anti-cytokine antibody was added and incubated for 20min at room temperature, protected from light. Cells were then washed twice with 2ml of permeabilization wash buffer and finally resuspended in cell staining buffer (BioLegend) for flow cytometry analysis on a MACSQuant VYB (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, Germany). Anti-cytokine antibodies used were APC-conjugated antihuman TNF- α (clone Mab11) or its mouse isotype control (clone MOPC21), PE-conjugated antihuman IL-6 (clone MQ2-13A5), anti-human IL-8 (E8N1), anti-human TNF-β (clone 359-81-11), antihuman TGF- β (TW4-2F8), anti-human IL-1 α (364-3B3-14), rat isotype control (clone RTK2071) and mouse isotype control (clone MOPC21) from BioLegend (San Diego, CA, USA), PE-conjugated antihuman IFN- γ (clone 4S.B3), anti-human IL-9 (MH9A3) and anti-human RANTES/CCL5 (clone 2D5) from BD Pharmingen (San Diego, CA, USA), or FITC-conjugated anti-human IL1-RA (CRM17) and its mouse isotype control (P3.6.2.8.1) from eBioscience (San Diego, CA, USA).

Cell cycle and proliferation

In order to determine the percentage of cells in the different phases of cell cycle, we used the EdUclick 555 (Jena Bioscience, Jena, Germany) combined with LMP1 and DAPI staining. EdU is a nucleoside analogue to thymidine incorporated into DNA, it reveals the proliferating cells in S phase. DAPI measures the total quantity of DNA in the cells and the LMP1 labelling enables to select only the LMP1-expressing cells for our study. Cells are induced with doxycyclin for 24h and, during the last 150min, 10µM EdU was added in the culture medium. Cells were, then, fixed with Fixation Buffer and permeabilized with Permeabilization Wash Buffer (BioLegend). For EdU revelation, cells were resuspended in the cocktail-click containing TAMRA-azide, incubated for 30min at room temperature protected from light and washed twice with 6ml PBS. LMP1 staining was performed as described previously for intracellular cytokine detection and cells were finally incubated in PBS with 1g/L glucose, DAPI 1:1000 and 100µg/ml RNAseA until flow cytometry analysis.

Statistical analysis

Means, standard deviations and p-values were calculated with the GraphPad InStat3 software (San Diego, CA, USA). All bar graphs represent means *as per* at least three independent experiments for cytokine detection and at least five independent experiments for cell cycle studies. Error bars represent standard deviations. To assess statistical differences, means were compared through a one-way ANOVA test followed by a Tukey post-test for multiple comparaison significance test between the analyzed groups. When specified, for single comparison of a population with the control cell group, the ANOVA test was followed by a Dunnett post-test. * stands for p<0.05, ** for p<0.01 and *** for p<0.001.

RESULTS

Characterization of the KMH2-pRT-LMP1 established cell lines

In order to study the impact of different LMP1 deletion variants on the behavior of the KMH2 HL cell line, we established three cell lines stably transfected with the pRT-LMP1 vector coding for either the wild-type form of LMP1 (WT-LMP1) or deleted variants (del30-LMP1; del69-LMP1). After electroporation and three weeks of hygromycin selection, presence of the plasmid and expression of viral genes were assessed by inducing cells with doxycyclin for 24h. Expectedly, RT-PCR showed that the EBNA1 gene was constitutively expressed in the three KMH2-pRT-LMP1 cell lines but not in the KMH2 cells. LMP1 was only expressed in presence of doxycyclin, as shown by RT-PCR (Fig.1a). A shift can be observed between the three PCR products of the LMP1 amplification corresponding to the 30bp and 69-bp deletions in the LMP1 gene. LMP1 inducible-expression was also observed by westernblotting (Fig.1b) and the precise number of cells expressing LMP1 in the three cell lines was determined by flow-cytometry (Fig.1c). On average, 25% of the KMH2-pRT-WT-LMP1 cells, 32% of the KMH2-pRT-del30-LMP1 cells and 20% of the KMH2-pRT-del69-LMP1 expressed LMP1 compared to non-induced cells. Attempts to enrich or clone LMP1 expressing cells (by selecting NGFRexpressing cells or subcloning) were unsuccessful since KMH2 cells express low level of endogenous NGFR and did not grow at low density. We thus used flow cytometry to gate the LMP1 positive cells among the established cell lines in all the next experiments.

LMP1 induces expression of several cytokines in KMH2 cells

Communication between HRS cells and the surrounding immune cells plays a major role in the development of HL. To examine the influence of LMP1 on HRS cytokine secretion, we studied intracellular cytokine expression by flow cytometry in KMH2 cells expressing LMP1 or stimulated by phorbol-myristate-acetate and ionomycine (PMA-iono) as positive control. We chose to study different cytokines involved in inflammatory processes, recruitement of immune cells and HL pathogenesis. After 24h of doxycyclin induction, all KMH2-pRT-LMP1 cells expressed TNF- α , TNF- β , IL-6, RANTES/CCL5 and IFN- γ (Table 1). On the contrary, none of the LMP1 variants induced expression of TGF- β , IL-8, IL-9, IL-1 α and IL-1RA, while stimulation of KMH2 with PMA-ionomycin induced all these cytokines (Table 1). Thus, LMP1 induced the expression of several cytokines in HL cells, promoting the establishment of an inflammatory microenvironment in favor of the tumor development.

del30-LMP1 induces cytokine expression at a lower level than the other LMP1 variants

Furthermore, we investigated the effect of the different LMP1 deletion variants on HRS cytokine secretion. IFN-y was significantly induced by WT-LMP1 (21.5 ± 5.8%) and del69-LMP1 (27.2 ± 3.4%) compared to LMP1 non-expressing cells (3.5 ± 3.3%) (Fig.2a). Interestingly, del30-LMP1 increased the number of IFN- γ producing cells to a significantly lesser extent (7.1 ± 3.4%) compared to the WT-LMP1 and del69-LMP1 variants, although to a significant amount compared to the non-induced cells. Likewise, the three LMP1 variants were able to induce IL-6 expression compared to non-induced cells $(1.1 \pm 1.0\%; Fig.2b)$. However, the number of del30-LMP1 cells was significantly lower $(30.5 \pm 6.9\%)$ than the two other variants WT-LMP1 (41.9 \pm 6.9%) and del69-LMP1 (57.4 \pm 12.9%). Also of note, a significant greater number of del69-LMP1 cells expressed IL-6 compared with the other variants (Fig.2b). The same observation can be made with RANTES/CCL5, whose expression is induced by all LMP1 variants compared to non-induced cells, and in a significantly higher proportion with the del69-LMP1 variant (control cells 11.7 ± 3.4%, WT-LMP1 34.0 ± 3.8%, del30-LMP1 27.7 ± 5.5%, del69-LMP1 46.2 \pm 6.3%) (Fig.2c). Two members of the TNF family were then analysed. TNF- β expression was induced by all LMP1 variants compared to KMH2 control cells (13.4 \pm 5.4%) with a significantly smaller percentage of del30-LMP1 cells expressing TNF- β (52.0 ± 4.0%) in relation to the two other variants WT-LMP1 (62.3 \pm 6.4%) and del69-LMP1 (71.7 \pm 5.6%) (Fig.2d). TNF- α expression was induced by LMP1 compared to non-induced KMH2 cells ($3.0 \pm 1.6\%$; Fig.2e). No significant difference could be observed between the LMP1 variants (WT-LMP1 21.7 \pm 2.4%; del30-LMP1 24.9 \pm 4.4%; del69-LMP1 21.1 ± 0.6%).

To sum up, del30-LMP1 tended to induce cytokine expression at a lower level compared with both variants WT-LMP1 and del69-LMP1. Nonetheless, del69-LMP1 seemed to induce more cytokine expression than the two other LMP1 variants.

LMP1 variants induce different changes in the cell cycle progression

The deletion variants of LMP1 have been shown to be more tumorigenic than WT-LMP1 (Hu et al., 1993; Sandvej, Munch, and Hamilton-Dutoit, 1996). In order to study the effect of LMP1 variants on the cell cycle progression in the KMH2 cell line, percentages of cells in the different phases of the cell cycle were determined by flow cytometry, using DAPI and EdU incorporation as shown in Figure 3a. Twenty four hours after induction, all LMP1-expressing cells show a significantly smaller percentage of cells in S phase than the control cells (Fig.3b). We verified that the observed effects were actually due to the expression of LMP1 rather than the presence of doxycyclin in the medium by inducing

non-transfected KMH2 cells with doxycyclin for 24h. Indeed, no difference could be detected between doxycyclin-induced and non-induced KMH2 cells (data not shown). It is worth noting that the expression of del30-LMP1 variant reduced the percentage of cells in S phase more significatively than the two other LMP1 variants (Fig.3b). If all LMP1 variants had an enhanced percentage of cells in G2/M phase compared to the control cells ($6.9 \pm 1.7\%$), WT-LMP1 induced a significantly higher accumulation of cells in G2/M phase ($14.2 \pm 1.6\%$) than the deletion variants del30-LMP1 ($9.9 \pm 1.6\%$) and del69-LMP1 ($9.0 \pm 0.8\%$) (Fig.3c). Interestingly, expression of del30-LMP1 promoted a significant accumulation of cells in G0/G1 phase ($56.9 \pm 2.6\%$) compared to the control cells ($40.5 \pm 4.4\%$) while WT-LMP1 ($37.8 \pm 0.8\%$) and del69-LMP1 ($42.6 \pm 2.6\%$) did not differ from non-induced cells (Fig.3d). Percentage of cells in sub-G0/G1 phase was slightly significantly increased by the expression of WT-LMP1 ($3.16 \pm 1.76\%$) and del69-LMP1 ($2.85 \pm 0.99\%$) compared to control cells ($1.14 \pm 0.67\%$)(data not shown). However, the number of cells in sub-G0/G1 was not significantly different compared with the control cells with the del30-LMP1 variant ($2.33 \pm 0.54\%$).

Thus, KMH2 cell cycle could be modified in a different manner by the LMP1 variants. WT-LMP1 provoked an accumulation of cells in G2/M phase, while del30-LMP1 did in G0/G1 phase (Fig.3e).

DISCUSSION

In the context of HL, where tumor cells represent only 0.1 to 1% of the cells surrounded by fibroblasts and immune cells, the communication between cells mediated by cytokines and chemokines is of upmost importance. LMP1 is a well known oncogene involved in many cellular signaling pathways and thus able to interfere in the cytokine secretion. In this study, we showed that LMP1 induced the expression of several cytokines in the KMH2 HL-derived cells, like IFN- γ , IL-6, RANTES/CCL5, TNF- β and TNF- α . These cytokines are mainly pro-inflammatory, attracting immune cells in the microenvironnement and known to be implicated in the developpement of HL (Khan, 2006; Skinnider and Mak, 2002).

Previously, LMP1 has been shown to induce IL-6 and IL-8 secretion in epithelial cells via the NF-κB pathway (Eliopoulos et al., 1999) and IL-10 in Burkitt lymphoma cells (Nakagomi et al., 1994). LMP1 also uses the NF-kB pathway to stimulate IFN secretion in LCL (Najjar et al., 2005). However, until now, little was known about the influence of LMP1 on cytokine production in the particular context of HL. Thus, highlighting some differences in cytokine expression between the three variants WT-LMP1, del30-LMP1 and del69-LMP1 could be interesting. While a significantly higher number of del69-LMP1 cells expressed IL-6 and RANTES, del30-LMP1 cells expressed IFN- γ , IL-6 and TNF- β in a significantly lesser extent than the other variants. IFN- γ is involved in the anti-viral response against EBV-infected cells. Inhibiting IFN-γ expression might be a way for del30-LMP1 infected cells to escape the immune anti-viral response. Besides, on the one hand, the presence of cytokines is necessary for cell survival and tumor promotion. Yet, on the other hand, an excessive cytokine secretion stimulates the recognition and degradation of EBV-infected cells by the immune system. The low level of cytokines expressed in del30-LMP1 KMH2 cells could be a mechanism for EBV to promote the development of HL while escaping the immune surveillance. These observations are consistent with the high frequency of del30-LMP1 variant observed among HIV positive people developing a HL (Dolcetti et al., 2001; Spina et al., 2011). On the contrary, the high proportion of del69-LMP1 HL cells to express pro-inflammatory cytokines could trigger their recognition by the immune system and would explain the low frequency of the del69-LMP1 variant, described only sporadically in NPC or some lymphoproliferative diseases. It would be of great interest to measure the level of cytokines in the plasma of people developing a HL, in order to see if it can be correlated with the presence of EBV and a variant of LMP1 in particular.

Oncogenic LMP1 has also a great influence on cell proliferation and survival by contributing to the cell cycle progression. Here we showed that all LMP1 variants influenced the cell cycle progression in KMH2. LMP1 caused a decrease in the number of cells in S phase, and this was particularly significant

for the del30-LMP1 variant. It could mean that cells were less proliferating (fewer synthesis of DNA) or on the contrary, the S phase was accelerated by LMP1 and cells accumulated at the next checkpoint of the cell cycle. With the WT-LMP1 variant, it resulted in an accumulation of cells in G2/M phase and with the del30-LMP1 variant in an accumulation of cells in G0/G1 phase. These observations were consistent with previous studies performed in NPC cell lines and LCLs with WT-LMP1 or a variant derived from a NPC and carrying the 30bp deletion (Deng et al., 2012; Floettmann et al., 1996). LMP1 has been described to promote cell cycle progression in different ways, accelerating the G1/S transition (Lo et al., 2004, (Tao et al., 2005), Guo et al., 2012) as well as impairing the G2 checkpoints leading to a possible accumulation of cells in G0/G1 phase, with unrepaired DNA damages (Deng et al., 2012). On the other hand, LMP1 has also been described to have cytostatic or even cytotoxic effects when expressed at high levels (Floettmann et al., 1996; Lam, Sandberg, and Sugden, 2004). A recent work suggests that the ability of LMP1 to exert both cytotoxic and pro-proliferative properties is necessary during the transformation process. While LMP1 induces cell death in the microenvironnement, only EBV infected cells expressing the oncogenic LMP1 survive (Brocqueville et al., 2013). The fact that LMP1 variants do not elicit the same effect on the cell cycle progression suggests that they have different impact on the cell cycle checkpoints. This could directly reflect on their oncogenic potential. Besides, cytokines itself can influence the cell cycle progression. For example, IL-8 is often overexpressed in cancers and contributes to the tumor development by promoting the G1/S transition of the cell cycle (Shao et al., 2013). It would be interesting to further investigate the cellular mechanism involved in the cell cycle progression with each LMP1 variant and particularly the impact of the LMP1-induced cytokines.

In conclusion, this study brings new insights into the impact of LMP1 on cytokine expression and cell cycle progression in HL. We highlight differences between LMP1 variants which could partly be responsible for their respective oncogenic properties.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by the Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les hépatites virales (ANRS), Sidaction, the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the University Joseph Fourier, the Grenoble University Hospital. We thank Evelyne Manet, Henri Gruffat (ENS-Lyon, France) and Xavier Ronot (FRE AGIM CNRS-UJF 3405, Grenoble, France) for helpful advice and discussions. We thank Rose-Laure Revel-Goyet, Françoise Lacroix and Jean-Philippe Kleman (Institut de Biologie Structurale, Grenoble) for the support and access to the Cell imaging Platform. This work used the platforms of

the Grenoble Instruct center (ISBG ; UMS 3518 CNRS-CEA-UJF-EMBL) with support from FRISBI (ANR-10-INSB-05-02) and GRAL (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology (PSB). V. B. is an INSERM scientist.

REFERENCES

- Baumforth, K. R., Flavell, J. R., Reynolds, G. M., Davies, G., Pettit, T. R., Wei, W., Morgan, S., Stankovic, T., Kishi, Y., Arai, H., Nowakova, M., Pratt, G., Aoki, J., Wakelam, M. J., Young, L. S., and Murray, P. G. 2005. Induction of autotaxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. Blood **106**(6), 2138-46.
- Brocqueville, G., Ndour, P. A., Ouk, T. S., Le Goff, A., De Witte, C., Mougel, A., Coll, J., Fafeur, V., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. 2013. LMP1-Induced Cell Death May Contribute to the Emergency of Its Oncogenic Property. PLoS One **8**(4), e60743.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. Immunity **9**(3), 405-11.
- Deng, W., Pang, P. S., Tsang, C. M., Hau, P. M., Yip, Y. L., Cheung, A. L., and Tsao, S. W. 2012. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 impairs G2 checkpoint in human nasopharyngeal epithelial cells through defective Chk1 activation. PLoS One **7**(6), e39095.
- Diehl, V., Kirchner, H. H., Burrichter, H., Stein, H., Fonatsch, C., Gerdes, J., Schaadt, M., Heit, W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Heintz, F., and Sueno, K. 1982. Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. Cancer Treat Rep **66**(4), 615-32.
- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L., and Hammerschmidt, W. 2003. Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by epstein-barr virus. Cancer Res **63**(11), 2982-9.
- Dolcetti, R., Boiocchi, M., Gloghini, A., and Carbone, A. 2001. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. Eur J Cancer **37**(10), 1276-87.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S. 1999. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. J Biol Chem **274**(23), 16085-96.
- Faumont, N., Chanut, A., Benard, A., Cogne, N., Delsol, G., Feuillard, J., and Meggetto, F. 2009. Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. Haematologica 94(3), 355-63.
- Faumont, N., Trempat, P., Brousset, P., Delsol, G., and Meggetto, F. 2004. In Hodgkin's disease Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes are infected by related Epstein-Barr virus strains. Virus Res **101**(2), 163-73.
- Floettmann, J. E., Ward, K., Rickinson, A. B., and Rowe, M. 1996. Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. Virology **223**(1), 29-40.
- Gruss, H. J., Pinto, A., Duyster, J., Poppema, S., and Herrmann, F. 1997. Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. Immunol Today **18**(4), 156-63.
- Guo, L., Tang, M., Yang, L., Xiao, L., Bode, A. M., Li, L., Dong, Z., and Cao, Y. 2012. Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. Int J Mol Med **29**(4), 574-80.
- Hadhri-Guiga, B., Khabir, A. M., Mokdad-Gargouri, R., Ghorbel, A. M., Drira, M., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., and Gargouri, A. 2006. Various 30 and 69 bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients. Virus Res 115(1), 24-30.

- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. 1988. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. Nucleic Acids Res **16**(15), 7351-67.
- Hu, L. F., Chen, F., Zheng, X., Ernberg, I., Cao, S. L., Christensson, B., Klein, G., and Winberg, G. 1993. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. Oncogene **8**(6), 1575-83.
- Jarrett, R. F. 2002. Viruses and Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol 13 Suppl 1, 23-9.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. Proc Natl Acad Sci U S A **90**(19), 9150-4.
- Khan, G. (2006). Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? Exp Hematol **34**(4), 399-406.
- Kis, L. L., Nishikawa, J., Takahara, M., Nagy, N., Matskova, L., Takada, K., Elmberger, P. G., Ohlsson, A., Klein, G., and Klein, E. 2005. In vitro EBV-infected subline of KMH2, derived from Hodgkin lymphoma, expresses only EBNA-1, while CD40 ligand and IL-4 induce LMP-1 but not EBNA-2. Int J Cancer **113**(6), 937-45.
- Knecht, H., Bachmann, E., Brousset, P., Sandvej, K., Nadal, D., Bachmann, F., Odermatt, B. F., Delsol, G., and Pallesen, G. 1993. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. Blood 82(10), 2937-42.
- Knecht, H., McQuain, C., Martin, J., Rothenberger, S., Drexler, H. G., Berger, C., Bachmann, E., Kittler, E. L., Odermatt, B. F., and Quesenberry, P. J. 1996. Expression of the LMP1 oncoprotein in the EBV negative Hodgkin's disease cell line L-428 is associated with Reed-Sternberg cell morphology. Oncogene 13(5), 947-53.
- Lam, N., Sandberg, M. L., and Sugden, B. 2004. High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. J Virol **78**(4), 1657-64.
- Le Clorennec, C., Ouk, T. S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C. C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimber-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J., and Jayat-Vignoles, C. 2008. Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8-mediated apoptosis. J Virol **82**(13), 6721-33.
- Lo, A. K., Huang, D. P., Lo, K. W., Chui, Y. L., Li, H. M., Pang, J. C., and Tsao, S. W. 2004. Phenotypic alterations induced by the Hong Kong-prevalent Epstein-Barr virus-encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells. Int J Cancer **109**(6), 919-25.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G. W., Raphael, M., Feuillard, J., and Fagard, R. 2005. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. J Virol **79**(8), 4936-43.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. 1994. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. Int J Cancer **57**(2), 240-4.
- Rickinson, K. 2007. "Epstein-Barr virus. ." Fields Virology (H. P. M. Knipe D.M., Griffin B.D., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. and Straus S.E. , Ed.), 2 Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia.
- Rothenberger, S., Bachmann, E., Berger, C., McQuain, C., Odermatt, B. F., and Knecht, H. 1997. Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NFkappaB-mediated transcription. Oncogene **14**(17), 2123-6.
- Sandvej, K., Munch, M., and Hamilton-Dutoit, S. 1996. Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. Clin Mol Pathol 49(5), M290-7.
- Shao, N., Chen, L. H., Ye, R. Y., Lin, Y., and Wang, S. M. 2013. The depletion of interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells. Biochem Biophys Res Commun **431**(3), 535-41.

Skinnider, B. F., and Mak, T. W. 2002. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. Blood **99**(12), 4283-97.

Spina, M., Carbone, A., Gloghini, A., Serraino, D., Berretta, M., and Tirelli, U. 2011. Hodgkin's Disease in Patients with HIV Infection. Adv Hematol **2011**.

Tao, Y., Song, X., Deng, X., Xie, D., Lee, L. M., Liu, Y., Li, W., Li, L., Deng, L., Wu, Q., Gong, J., and Cao,
Y. 2005. Nuclear accumulation of epidermal growth factor receptor and acceleration of G1/S stage
by Epstein-Barr-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. Exp Cell Res 303(2), 240-51.

Young, L. S., and Murray, P. G. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. Oncogene **22**(33), 5108-21.

Young, L. S., and Rickinson, A. B. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. Nat Rev Cancer 4(10), 757-68.

Zuercher, E., Butticaz, C., Wyniger, J., Martinez, R., Battegay, M., Boffi El Amari, E., Dang, T., Egger, J.
 F., Fehr, J., Mueller-Garamvogyi, E., Parini, A., Schaefer, S. C., Schoeni-Affolter, F., Thurnheer, C.,
 Tinguely, M., Telenti, A., and Rothenberger, S. 2012. Genetic Diversity of EBV-Encoded LMP1 in
 the Swiss HIV Cohort Study and Implication for NF-Kappab Activation. PLoS One 7(2), e32168.


Fig 1: Characterization of the KMH2-pRT-LMP1 established cell lines. (a) RT-PCR or (b) western blot of EBNA1 and doxycyclin-induced cells expressing WT-LMP1, del30-LMP1 and del69-LMP1 variants. 293-HEK cells transiently transfected with pcDNA-WT-LMP1 were used as positive control for immunoblotting. (c) Comparison of LMP1 expression by flow-cytometry in the KMH2-pRT-LMP1 cells. Doxycyclin-induced cells are represented in green and non-induced cells in black. Data are representative of 3 experiments.

Table 1: Cytokine expression induced in Hodgkin's lymphoma-derived cells. Cytokine expression was assessed by flow cytometry analysis after induction of KMH2 cells with PMA-ionomycin or doxycyclin for 24h.

	KMH2 PMA-iono	KMH2 pRT-WT-LMP1	KMH2 pRT-del30-LMP1	KMH2 pRT-del69-LMP1
TNF-α	+	+	+	+
TNF-β	+	+	+	+
IL-6	+	+	+	+
RANTES/CCL5	+	+	+	+
IFN-γ	+	+	+	+
TGF-β	+	-	-	-
IL-8	+	-	-	-
IL-9	+	-	-	-
IL-1α	+	-	-	-
IL-1RA	+	-	-	-



Figure 2: Cytokine expression is differently regulated by LMP1 variants. Cytokines expressed by KMH2-pRT-LMP1 cells (non induced, WT, del30 and del69) were intracellularly stained and detected by flow-cytometry 24h after induction of LMP1 expression. The percentages of cells expressing (a) IFN- γ , (b) IL-6, (c) RANTES/CCL5, (d) TNF- β and (e) TNF- α were compared. All cytokines were significantly more expressed in LMP1 expressing cells compared to non-induced cells with an ANOVA analysis (of note that expression of IFN- γ was significantly higher in KMH2-pRT-del30-LMP1 cells compared to the control unstimulated KMH2 cells with an ANOVA analysis followed by a Dunnett post-test).







G0/G1

(d)





Figure 3: LMP1 influences cell cycle progression in the KMH2 Hodgkin's lymphoma cell lines. Percentage of cells in the different phases of the cell cycle was assessed by measurement of EdU incorporation and DAPI staining by flow cytometry after induction of LMP1 expression in the KMH2pRT-LMP1 cell lines (non-induced, WT, del30 and del69). (a) example of cell cycle dot plot, (b) cells in S phase, (c) cells in G0/G1 phase and (d) cells in G2/M phase. (e) Repartition of cells in the different phases of the cell cycle represented in a stacked histogram.

Partie II

Caractérisation *ex vivo* des variants de LMP1 - Séquençage nouvelle génération

Dans cette deuxième partie clinique, j'ai recherché LMP1 par nested-PCR et séquençage nouvelle génération dans le sang total et les cellules oropharyngées des patients de la cohorte Lymphovir (CO16-ANRS), patients VIH+ ayant développé un LH, ainsi que de deux populations contrôle de patients VIH+ ou ayant développé un LH. Je présente dans un premier temps la technique de séquençage nouvelle génération du GS Junior, qui nous a permis de séquencer LMP1 et de détecter la présence des différents variants avec une bonne sensibilité. Puis, j'ai comparé la fréquence des variants LMP1-WT, LMP1-del30 et LMP1-del69 dans les différentes populations et entre les différents compartiments biologiques et étudié le polymorphisme de LMP1. J'ai également analysé les données cliniques des patients en fonction de la présence des variants de LMP1, afin de mettre en évidence si les variants délétés de LMP1 peuvent être considérés comme des facteurs de risque favorisant la survenue des LH.

MATERIELS ET METHODES

I. Collecte et extraction des échantillons cliniques

1. Echantillons

La cohorte LYMPHOVIR (ANRS CO16) recrute depuis juillet 2008 des patients VIH+ développant un lymphome. 40 centres participent à cette cohorte au niveau national. Parmi les patients recrutés dans cette cohorte, nous nous sommes intéressés exclusivement aux patients développant un LH, chez qui le sang total et la salive ont été recueillis. En guise de populations contrôles, le sang total et la salive de patients VIH+ (population VIH+) ou ayant développé un LH (population LH) ont été récoltés au CISIH (Centre d'Information et de Soins de l'Immunodéficience Humaine) et dans le service d'Hématologie Clinique, dans le cadre d'une collection d'échantillons biologiques pour le laboratoire de virologie du CHU de Grenoble. Les fiches d'informations et de consentement destinées aux patients sont fournies en annexe I et II.

Les prélèvements de salive ont été réalisés à l'aide d'une salivette (Sarstedt) (Figure 26). Il est demandé au patient de mâcher pendant quelques minutes un morceau de coton imbibé d'acide citrique, qui stimule la salivation, en le frottant le long de ses joues afin décrocher des cellules épithéliales. Le coton imbibé et la salive sont ensuite recrachés dans le compartiment supérieur du tube et centrifugés 10min à 1500rpm. Le surnageant salivaire est séparé du culot sec contenant les cellules épithéliales et le tout est conservé à -80°C.



Bouchon

Coton imbibé d'acide citrique

Insert percé

Tube collecteur de salive

Figure 26 : Principe de la salivette. A. salivette assemblée. B. Détail des différents éléments de la salivette

2. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est réalisée sur 180µl de PBS, utilisés pour resuspendre le culot sec de cellules épithéliales, ou 180µl de sang total avec le kit QIAamp DNA extraction (Qiagen). Vingt microlitres de protéinase K et 200µl de tampon de lyse sont ajoutés à l'échantillon, vortexés et incubés 10min à 56°C. Deux cent microlitres d'éthanol pur sont ajoutés, vortexés et l'ensemble est déposé dans une colonne d'extraction, centrifugée 1min à 8000rpm. La colonne est rincée avec 500µl de tampon de rinçage AW1, centrifugée 1min à 8000rpm, puis rincée avec 500µl de tampon de rinçage AW2, centrifugée 3min à 13000rpm puis 1min supplémentaire à 13000rpm. L'ADN est finalement élué dans 30µl d'eau stérile, quantifié au Nanodrop et conservé à -80°C.

II. Séquençage nouvelle génération (NGS)

Afin de détecter les différents variants de LMP1 dans nos échantillons cliniques, nous avons fait appel à une technique de séquençage nouvellement disponible au CHU de Grenoble, la technologie 454 du GS Junior (Roche) (Figure 27). Cette technique, basée sur le principe du pyroséquençage, permet d'obtenir une sensibilité de détection des variants que les techniques de laboratoire actuelles (autour de 5 à 20% en fonction des appareils) en un temps très court. En effet, une réaction de séquençage avec le GS Junior permet d'obtenir environ 80 000 séquences. La sensibilité de détection d'un variant dans un échantillon clinique est donc fonction du nombre d'échantillons analysés et peut être inférieure à 1%.



Figure 27 : Déroulement d'une réaction de séquençage avec le GS Junior. Une réaction de séquençage commence par la préparation de la librairie d'ADN à séquencer, constituée d'amplicons de LMP1 issus de différents échantillons cliniques mélangés de façon équimoléculaire. Les brins d'ADN de la librairie sont ensuite fixés sur des billes de capture afin d'être amplifiés par PCR en émulsion. Les billes de capture portant l'ADN sont chargées sur une puce de séquençage, avec tous les réactifs nécessaires et le séquençage se déroule sur environ 10h. Les données de séquençage collectées sont finalement analysées avec le logiciel AVA (Amplicon Variant Analysis).

1. Préparation de la librairie d'ADN

1.1. Nested PCR

La partie C-terminale de LMP1 entourant les délétions de 30 ou 69pb est amplifiée par deux PCR successives. La première PCR (PCR1) est réalisée à partir de 40 à 200ng d'ADN total, avec les amorces LMP1-1sens (5'-AGACACCACCTGCTCGTGAGTGGAGC-3') et LMP1-1antisens (5'-GGCAAGCCTATGACATGGTAATGCCTAG-3'). La seconde PCR (PCR2) est réalisée à partir de 2µl de la PCR1, avec des amorces adaptées au séquençage, A-MID-LMP1 et B-LMP1 (Figure 28). Ces amorces sont constituées d'une partie spécifique pour l'amplification de LMP1 et d'adaptateurs A et B nécessaires aux étapes de purification et d'initiation du séquençage. Sur l'amorce avec l'adaptateur A est ajoutée une séquence de 6 nucléotides (=MID, Multiplex Identifier), permettant d'identifier, comme un code barre, les échantillons cliniques et de les mélanger lors du séquençage. Les séquences pourront être réattribuées à chaque échantillon clinique après le séquençage grâce à l'analyse et au tri des MID. La liste des MID utilisés est fournie en annexe III. Les mélanges réactionnels et programmes de thermocycleurs utilisés pour les PCR1 et PCR2 sont décrits dans les tableaux 8 et 9. Dix microlitres de la PCR2 de chaque échantillon à séquencer sont migrés sur gel d'agarose 2% afin de vérifier l'amplification correcte de LMP1.

5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACT		CTCATAGCCCTAGCGACTC-3'
adaptateur A	MID	séquence spécifique de LMP1
5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCT		TCATCTCCACCGG-3'
adaptateur B	séqu	ence spécifique de LMP1

Figure 28 : Détail des amorces utilisées pour le séquençage GS Junior. Les amorces possèdent chacune une partie spécifique de LMP1 et un adaptateur A ou B nécessaire lors des étapes de purification et d'initiation du séquençage. Le MID est une séquence de 6 nucléotides, permettant d'identifier chaque échantillon clinique dans la librairie d'ADN.

Tableau 8 : Mix utilisés pour les PCR1 et PCR2

	PCR1	PCR2
Tampon 5X	10µl	10µl
dNTP (10mM chacun)	1µl	1μΙ
Amorce LMP1-1sens (1pmol/µl)	1µl	
Amorce LMP1-1antisens (1pmol/µl)	1µl	
Amorce A-MID-LMP1 (10pmol/µl)		1μΙ
Amorce B-LMP1 (10pmol/µl)		1μΙ
Phusion	0,2µl	0,2μΙ
ADN	40 à 200ng, max 5µl	2μl PCR1
H2O	QSP 50µl	QSP 50µl

PCR1								
Cycle 1 (x1)	Cycle 2 (x40)	Cycle 3 (x1)						
94°C	94°C	61°C	72°C	72°C				
5min	40sec	40sec	40sec	5min				
PCR2								
Cycle 1 (x1)	Cycle 2 (x30)			Cycle 3 (x1)				
94°C	94°C	60°C	72°C	72°C				
5min	30sec	30sec	30sec	5min				

1.2. Préparation de la librairie d'ADN

Les produits de PCR2 sont quantifiés au Quant-iT picogreen (Invitrogène) et leur concentration en ng/µl est convertie en nombre de molécules/µL selon la formule :

C° (molécules/
$$\mu$$
I) =
$$\frac{C^{\circ} (ng/\mu I) \times 6,022.10^{23}}{6,566.10^{11} \times \text{taille du fragment d'ADN (pb)}}$$

Ils sont ensuite mélangés de façon équimoléculaire en prenant 10¹¹ molécules pour chaque produit de PCR, ou un volume maximum de 20µl. La précision de cette étape est essentielle afin d'assurer une représentation équivalente de tous les produits de PCR lors du séquençage. Jusqu'à 50 échantillons cliniques peuvent être mélangés afin de constituer la librairie d'ADN.

1.3. Purification et contrôle de la librairie d'ADN

La librairie d'ADN ainsi constituée est purifiée par AMPure XP (Beckman Coulter) pour éliminer les nucléotides libres et les éventuels dimères d'amorces formés lors de la PCR. 50µl de la librairie sont prélevés et dilués avec 50µl d'eau stérile dans un tube Eppendorf. 160µl de billes d'AMPure sont ajoutés, vortexés à faible puissance et incubés 5min à température ambiante afin de fixer les fragments d'ADN supérieurs à 100pb. Le tube eppendorf est placé sur un portoir magnétique qui attire les billes d'AMPure ayant fixé l'ADN à purifier. Après deux rinçages à l'éthanol 70%, l'ADN est élué des billes d'AMPure dans 25µl de TE.

La qualité et la pureté de la librairie sont contrôlées par migration d'1µl de l'élution sur une puce Agilent DNA 1000, dans un Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Cette étape permet de vérifier la présence de fragments d'ADN ayant la taille attendue après l'amplification de LMP1 (LMP1-WT 344pb, LMP1-del30 314pb, LMP1-del69 275pb) ainsi que l'absence d'éventuels dimères d'amorces qui parasiteraient l'étape de PCR en émulsion. Si des dimères d'amorces sont observés, il est nécessaire de répéter l'étape de purification par AMPure. L'analyse sur la puce à ADN renseigne également sur la concentration finale en ADN de la librairie purifiée, en additionnant les concentrations correspondant aux trois fragments LMP1 (Figure 29). Une partie de la librairie est finalement diluée dans du TE afin d'obtenir une concentration finale de 10⁶ molécules/µl, en faisant des dilutions intermédiaires au 1/10.



Figure 29 : Exemple de résultat d'une puce Agilent DNA1000. Les fragments d'ADN sont séparés par migration en fonction de leur taille, en présence de contrôles internes de haut ou bas poids moléculaire. (a) l'électrophorogramme renseigne sur la taille du fragment d'ADN et sa concentration, proportionnelle à l'aire sous la courbe de chaque pic. (b) représentation des fragments d'ADN sous forme de bande d'intensité proportionnelle à leur concentration. (c) Rapport détaillé des tailles et concentrations des fragments d'ADN analysés.

2. PCR en émulsion (emPCR)

L'ADN de la librairie est fixé sur des billes de capture grâce à l'adaptateur B et émulsionné dans un mélange eau dans l'huile afin de former des microréacteurs contenant une seule bille et tous les réactifs nécessaires à une PCR (Figure 30). L'émulsion est répartie par 100µl dans une plaque 96puits placée dans un thermocycleur. Lors de l'emPCR, chaque brin d'ADN est alors amplifié autour d'une bille en des millions d'exemplaires. Il est très important de connaître précisément le nombre de fragments d'ADN utilisés et d'utiliser un nombre de billes en excès afin que sur chaque bille de capture ne se fixe qu'un unique fragment d'ADN. Un trop grand nombre de fragment d'ADN peut conduire à la fixation de plusieurs fragments sur une seule bille de capture. Les deux fragments seront alors amplifiés sur la même bille lors de l'emPCR et conduiront à l'obtention d'un signal non spécifique lors du séquençage. Si des dimères d'amorce sont encore présents dans la librairie après la purification, ils vont également se fixer sur des billes et être amplifiés lors de l'emPCR. Ces billes seront utilisées pour préparer la plaque de séquençage mais seront éliminées lors des contrôles postséquençage car leur séquence est trop courte. Elles diminuent donc le rendement du séquençage, c'est-à-dire le nombre de séquences totales obtenues pour les échantillons cliniques. Dans nos conditions expérimentales, le rapport ADN/nombre de billes choisi est de 0,7, soit 7 millions de fragments d'ADN pour 10 millions de billes de capture.



Figure 30 : Principe de la PCR en émulsion. (d'après my454.com) Une émulsion de type eau dans l'huile permet à chaque bille de capture d'être individualisée dans une gouttelette contenant tous les réactifs nécessaires à une PCR. Des milliers de PCR vont donc se dérouler en même temps, dans chaque gouttelette formée, amplifiant un brin d'ADN fixé sur la bille de capture.

Après l'emPCR, l'émulsion est cassée, les billes de capture sont collectées et lavées à plusieurs reprises par de l'isopropanol et de l'éthanol. Afin d'éliminer toutes les billes excédentaires sans ADN, une étape d'enrichissement est réalisée. Les billes sont placées quelques minutes dans une solution de soude 0,125N afin de dissocier les doubles brins d'ADN, rincées, puis une amorce d'enrichissement biotinylée, se fixant sur les monobrins d'ADN est incubée quelques minutes avec les billes. Des billes d'enrichissement magnétiques couplées à la streptavidine sont alors ajoutées, la streptavidine réagissant avec la biotine de l'amorce d'enrichissement. Les billes magnétiques sont collectées par un portoir magnétique, entrainant les billes portant l'ADN. Plusieurs lavages sont réalisés afin d'enlever toutes les billes sans ADN. Les billes portant l'ADN sont finalement détachées des billes d'enrichissement magnétiques par une solution de soude à 0,125N. Les billes magnétiques sont retenues par le portoir magnétique et les billes portant l'ADN sont récupérées dans le surnageant (Figure 31).



Figure 31 : Enrichissement des billes portant de l'ADN. (d'après my454.com) (a) dénaturation des double brins d'ADN par une solution de soude (b) hybridation sur l'ADN d'une amorce d'enrichissement biotinylée (c) ajout de billes magnétiques couplées à la straptevidine (d) fixation des billes magnétiques uniquement sur les billes où de l'ADN a été amplifié lors de l'emPCR grâce à l'interaction biotine-streptavidine (e) capture sur un aimant des billes portant de l'ADN et élimination des billes vides (f) élution des billes portant l'ADN par un traitement à la soude

A la fin de cette étape, la quantité de billes récupérée est estimée dans le compteur de billes, elle doit se situer entre 5.10⁵ et 2.10⁶ (Figure 32). Une quantité de bille inférieure signifie que trop peu de fragments d'ADN ont été fixés par les billes de capture et amplifiés par l'emPCR. Il n'y a pas assez de billes pour que la réaction de séquençage ait un bon rendement. Si plus de 2.10⁶ billes sont récupérées, soit trop de fragments d'ADN ont été fixés sur les billes de capture et le risque est grand que plusieurs fragments soient amplifiés sur une même bille, la réaction de séquençage ne sera pas de bonne qualité, soit la purification des billes portant l'ADN a été mal réalisée et il reste beaucoup de billes vides qui vont diminuer le rendement du séquençage.

Après avoir collecté les billes portant l'ADN et vérifié que l'enrichissement est correct, l'amorce d'initiation du séquençage est ajoutée sur les billes, le tout est incubé à 65°C pendant 5min. L'amorce s'hybride sur l'adaptateur A des fragments d'ADN. Les billes sont ensuite rincées pour éliminer l'excès d'amorce de séquençage et 5.10⁵ billes sont prélevées pour la réaction de séquençage. Les billes peuvent être conservées à +4°C jusqu'à deux semaines avant la réaction de séquençage.

Le protocole complet et détaillé de l'emPCR est disponible sur le site internet my454.com (emPCR Amplification Method Manual – Lib-L).



Figure 32 : Evaluation du nombre de billes purifiées. (d'après my.454.com) Le compteur de billes permet d'évaluer le nombre de billes portant de l'ADN purifiée après l'emPCR. Le bas de la fenêtre correspond à 5.10^5 billes, soit un rendement de 5% par rapport aux 10.10^6 billes de captures initiales. Le haut de la fenêtre correspond à 2.10^6 billes, soit un rendement de 20%.

3. Séquençage

3.1. Préparation de la plaque de séquençage

Le séquençage se déroule dans une plaque spécifique, la picotiterplate (PTT). Celle ci est constituée de 300 000 puits pouvant contenir chacun une bille portant l'ADN à séquencer (Figure 33). Une nouvelle PTT est utilisée pour chaque réaction de séquençage. Le chargement de la plaque consiste à distribuer dans les puits différents types de billes, par centrifugations successives. Certaines billes portent les enzymes nécessaires à la réaction de pyroséquençage, telles que la sulfurylase et la luciférase ou encore des PPiases. D'autres sont de petites billes de remplissage utilisées pour combler les espaces vides dans les puits, et enfin les billes portant l'ADN à séquencer ou des billes portant un ADN de contrôle. La répartition des billes dans chaque couche de centrifugation est décrite dans la figure 33d. Après avoir chargé la PTT, celle-ci est disposée dans le GS Junior, et la réaction de séquençage est lancée, elle dure environ une dizaine d'heures.

La description précise de toutes les étapes de préparations des billes, de chargement de la PTT ainsi que du lancement de la réaction de séquençage sont décrites dans le Sequencing Method Manual (www.my454.com)



Figure 33 : Remplissage d'une plaque de séquençage (PTT). (a) la dimension des puits de la PTT est prévue pour accueillir une unique bille portant de l'ADN. (b) les billes portant l'ADN sont maintenues dans les puits par des billes de remplissage beaucoup plus petites. (c) vue en microscopie d'une PTT chargée (d) types de billes distribuées par centrifugation en couches successives lors du chargement de la PTT.

3.2. Principe du pyroséquençage



Figure 34 : Principe du pyroséquençage

Lors de la réaction de séquençage, des nucléotides sont distribués en cycles, chacun leur tour, sur la plaque de séquençage. L'incorporation d'un nucléotide dans la chaîne d'ADN par la polymérase libère un pyrophosphate, utilisé par une sulfurylase qui convertit l'adenosine phosphosulfate (APS) en adénosine triphosphate (ATP). L'ATP catalyse ensuite la transformation par la luciférase de luciférine en oxyluciférine, réaction qui génère un signal lumineux d'intensité proportionnelle à la quantité d'ATP formé et donc au nombre de nucléotides incorporés. La lumière émise lors de cette réaction est captée par une caméra et analysée par un logiciel bioinformatique. Les nucléotides non incorporés sont dégradés par une apyrase avant la distribution du nucléotide suivant. Chaque nucléotide adénine, thymine, guanine et cytosine sont ainsi distribués chacun leur tour 200 fois (Figure 34).

3.3. Analyse avec le logiciel AVA

Les séquences obtenues, environ 80 000 par réaction de séquençage, sont triées en fonction de leur MID par un programme LINUX « maison », fourni par Réjane Beugnot. Pour chacun des MID, les séquences sont alors comparées à la séquence de référence B95-8 par le logiciel AVA (Amplicon Variant Analysis, 454, Roche), qui analyse toutes les modifications de séquences observées par rapport à la séquence de référence : mutations ponctuelles, insertions et délétions.

RESULTATS

I. La technique de séquençage GS Junior

1. Choix du cut-off

Cette technique de séquençage étant très récente, il n'a pas été défini encore de cut-off standard pour l'analyse des séquences. Nous avons choisi arbitrairement un cut-off de 10 séquences. C'est-à-dire que dans un échantillon clinique, on considère qu'une séquence est réellement représentée si elle a été séquencée au minimum à 10 reprises. Les séquences présentes en moins de 10 exemplaires lors de l'analyse sont considérées comme pouvant être des erreurs de séquençage et ne sont pas prises en compte. En fonction du nombre de séquences obtenues par échantillon, ce cut-off de 10 séquences va définir la limite de sensibilité de détection des variants. Par exemple, dans un échantillon clinique pour lequel nous avons obtenu 1000 séquences, le cut-off de 10 séquences nous permet d'atteindre une sensibilité de 1%. La sensibilité pourra descendre à 0,3% pour un échantillon pour lequel nous obtenons 3000 séquences et sera en revanche un peu moins bonne pour les échantillons ayant un moins grand nombre de séquences.

2. Test de fiabilité et de sensibilité

Afin de contrôler la sensibilité et la fiabilité de la technique de pyroséquençage, six échantillons correspondant à des mélanges de plasmides pRT-LMP1 (WT, del30 ou del69) en différentes proportions ont été séquencés avec le GS Junior (Figure 35a). Nous avons obtenu en moyenne 512 séquences/échantillon. Il est intéressant de noter que les variants présents à 10% ou moins dans les échantillons ne sont pas observés sur gel d'agarose, alors qu'ils sont détectés lors du séquençage. Cela représente une nette amélioration de la sensibilité de détection des variants par rapport à la simple lecture sur gel d'agarose ou aux séquenceurs de laboratoire utilisant la technique de Sanger, dont la sensibilité est aux alentours de 10-20%. De plus, les pourcentages effectifs calculés après séquençage montrent une très bonne corrélation avec les pourcentages théoriques, avec des coefficients de corrélation de 0,995, 0,988 et 0,980 pour les variants LMP1-WT, LMP1-del30 et LMP1-del69 respectivement (Figure 35b,d). Le principal avantage de cette technique de séquençage est la sensibilité de détection des variants minoritaires, elle n'a pas pour but d'être une technique quantitative. Néanmoins, notre test met en évidence que la proportion de chaque variant est respectée lors de l'amplification par nested-PCR (Figure 35c) et se retrouve bien lors de l'analyse des séquences.

LMP1-WT LMP1-del30 LMP1-del69 LMP1-del69 Nombre de séquences obtenues au GS Junior % % # % # % # GS Junior 1 33 33 33 33,9 255 24,8 187 41,3 311 753	(-)	J	9		(-)	J			1	5-					
% % # % # % # Obtenues and GS Junior 1 33 33 33 33,9 255 24,8 187 41,3 311 753 2 49 49 2 53 479 44.6 403 2.1 10 901		LMP1-WT	WT LMP1-del30	LMP1-del69	LMP1	LMP1-WT		LMP1-WT		LMP1-WT LMP1-de		1-del30 LMP1-del69		-del69	Nombre de séquences
1 33 33 33 33,9 255 24,8 187 41,3 311 753 2 49 49 2 53 479 44.6 403 2.1 19 901		%	%	%	%	#	%	#	%	#	GS Junior				
2 49 49 2 53 470 446 403 21 10 001	1	33	33	33	33,9	255	24,8	187	41,3	311	753				
	2	49	49	2	53	479	44,6	403	2,1	19	901				
3 47,5 5 47,5 48,7 265 3,2 17 48,1 262 544	3	47,5	5 5	47,5	48,7	265	3,2	17	48,1	262	544				
4 90 10 0 96,7 327 3,3 11 0 0 338	4	90	10	0	96,7	327	3,3	11	0	0	338				
5 2 88 10 1,0 2 90,7 180 8,3 16 198	5	2	88	10	1,0	2	90,7	180	8,3	16	198				
6 100 0 0 0 334 0 0 334	6	100) 0	0	100	334		0		0	334				



(b) Pourcentages effectifs après séquençage

(c)



(d)

Ctrl+



Figure 35 : Test de fiabilité et de sensibilité du GS Junior. (a) pourcentages des différents variants mélangés dans les six échantillons tests (b) nombre de séquences et pourcentages obtenus pour chacun des variants lors du séquençage. En noir, seulement deux séquences du variant LMP1-WT ont été détectées dans cet échantillon. Cette valeur étant inférieur au cut-off de 10 séquences, les séquences ne sont pas prises en considération et le pourcentage de LMP1-WT est donc 0% (c) Visualisation des six produits de PCR sur gel d'agarose à 2% avant le séquençage (d) représentation des pourcentages effectifs en fonction du pourcentage théorique de chaque variant, avec le coefficient de corrélation linéaire.

II. Résultats de séquençage des échantillons cliniques

1. Prévalence de LMP1

Depuis juillet 2008 jusqu'à présent, 62 patients ont été recrutés dans la cohorte Lymphovir (LH/VIH). Pour notre étude, des échantillons sanguins étaient disponibles pour 55 de ces patients, identifiés LH/VIH1 à LH/VIH55, pour 43 desquels nous avons également obtenus des cellules oropharyngées. Pour deux patients, nous n'avons étudié que les cellules oropharygées (LH/VIH56 et LH/VIH57). La présence de LMP1 a pu être confirmée par amplification et séquençage dans 35 des 55 sangs totaux (63,6%) et dans 23 des 45 échantillons de cellules oropharyngées (51,1%) (Tableau 10).

Une population contrôle de 47 patients VIH+ a été recrutée au CISIH du CHU de Grenoble en janvier et février 2012, identifiés VIH1 à VIH47, et pour lesquels nous avons obtenu à la fois du sang total et des cellules oropharyngées. LMP1 a été détecté dans 24 des 47 échantillons sanguins (48,9%) et 35 des 47 échantillons de cellules oropharyngées (74,5%).

Une autre population contrôle de 14 patients développant un LH, identifiés LH1 à LH14, a été recrutée au service d'hématologie du CHU de Grenoble entre janvier 2011 et juin 2013, pour lesquels du sang total et des cellules oropharyngées ont été collectés. LMP1 a pu être séquencé dans 3 des 14 sangs totaux (21,4%) et dans 6 des 14 échantillons de cellules oropharyngées (42,9%).

Au total, cela représente 222 échantillons cliniques issus de 118 patients. Les données cliniques disponibles pour les patients LH/VIH+ et la population contrôle de patients VIH+ sont présentés et discutés dans le chapitre III de cette partie. LMP1 a pu être amplifié et séquencé dans 126 des échantillons cliniques. L'ensemble des séquences détectées dans chacun des échantillons cliniques est présenté en annexe IV.

Compartiment biologique	Population	Nombre d'échantillons LMP1+ n (%)	p-value	Nombre total d'échantillons
Sang total	LH+/VIH+	35 (63,6)	. <u>1</u>	55
	VIH+	24 (51,1)	0,0046	47
	LH	3 (21,4)		14
Cellules	LH+/VIH+	23 (51,1)	1 0.02	45
oropharyngées	VIH+	35 (74,5)	-] 0,02	47
	LH	6 (42,9)	0,027	14

Tableau 10 : Prévalence d	e LMP1 dans les différentes	s populations et compai	timents biologiques.
		populations of compa	timente storegiqueet

Seules les p-values indiquant des différences significatives ont été indiquées, calculées avec le test du Chi2.

La prévalence de LMP1 est significativement plus importante dans les cellules oropharyngées des patients VIH+ (74,5%) que chez les patients LH/VIH (51,1%) et LH (42,9%). Par ailleurs, la prévalence de LMP1 est significativement plus importante dans le sang total des patients séropositifs VIH (LH/VIH et VIH+) que dans la population contrôle des patients LH séronégatifs VIH. Cependant, il faut remarquer que la fréquence de détection de LMP1 dans la population contrôle LH est anormalement basse (21,4%). Notre faible effectif peut expliquer que l'on ne retrouve pas les prévalences habituelles d'EBV de 62-66% dans le sang total des patients LH (Hohaus *et al.,* 2011; Spacek *et al.,* 2011).

Dans la population contrôle VIH+, la prévalence de LMP1 est significativement supérieure dans les cellules oropharyngées (74,5%) que dans le sang total (51,1%) (p=0,02). Cette différence n'est pas observée dans les deux autres populations.

2. Sensibilité de détection des variants

Le tableau 11 récapitule les variants détectés par séquençage, ainsi que leur proportion, dans chaque échantillon clinique où LMP1 a pu être amplifié par PCR. Les pourcentages indiqués sont calculés par le logiciel AVA d'après les données du séquençage. Notre test initial nous a permis de mettre en évidence que les PCR successives d'amplification et de séquençage de LMP1 respectent les proportions initiales des variants présents dans l'échantillon clinique. Cependant, les valeurs indiquées ici ne peuvent pas être considérées comme quantitatives, mais plutôt comme indicatives.

Dans 16 échantillons biologiques, la sensibilité du GS Junior a permis de détecter des variants de LMP1 représentant 10% ou moins des séquences et qui, pour la plupart, n'étaient pas visibles sur gel d'agarose. La meilleure sensibilité a été obtenue pour le patient LH/VIH1 où le variant LMP1-del30 représente seulement 0,5% des variants présents dans le sang total.

		Sang Total		Cellule	es Orophar	yngées			Sang Total		Cellule	es Orophan	yngées
	LMP1-WT	LMP1-	LMP1-	LMP1-WT	LMP1-	LMP1-		LMP1-WT	LMP1-	LMP1-	LMP1-WT	LMP1-	LMP1-
	(%)	del30 (%)	del69 (%)	(%)	del30 (%)	del69 (%)		(%)	del30 (%)	del69 (%)	(%)	del30 (%)	del69 (%)
VIH2		100				. ,	LH/VIH1	99,5	0,5				, <i>i</i>
VIH3		100			94	6	LH/VIH2				100		
VIH5	100			100			LH/VIH3			100	4,4		95,6
VIH6						100	LH/VIH4		100				
VIH7	100			25		75	LH/VIH6	5	95		100		
VIH8							LH/VIH7		100				
VIH9				100			LH/VIH8		100				
VIH10	100			100			LH/VIH9		100				
VIH11		100			100		LH/VIH11	98	2		100		
VIH13				100			LH/VIH12	35		65			
VIH14		100			100		LH/VIH13		100				
VIH16	100			10		90	LH/VIH14	100			100		
VIH17				100			LH/VIH17	100					
VIH18	100			100			LH/VIH18		100				
VIH19				100			LH/VIH19	100			82	18	
VIH20				100			LH/VIH21	100					
VIH21		100			100		LH/VIH23		100			100	
VIH22	100			100			LH/VIH24		100		1	99	
VIH23	50	50			92	8	LH/VIH26	100			100		
VIH24	100			100			LH/VIH28	100					
VIH25				92	8		LH/VIH29				100		
VIH26					98,5	1,5	LH/VIH31	100			100		
VIH27				100			LH/VIH32	40	60		20	80	
VIH28		100			100		LH/VIH33						100
VIH29	32	68			100		LH/VIH34		100		50	50	
VIH30				100			LH/VIH35	98,2	1,8				
VIH32		100			100		LH/VIH38		100			100	
VIH33				10		90	LH/VIH39		100				
VIH35				100			LH/VIH40				100		
VIH36		100		100			LH/VIH41		100		2,5	97,5	
VIH37	100			100			LH/VIH42		100				
VIH38		90	10		100		LH/VIH43		100				
VIH41		100			100		LH/VIH44	2	98				
VIH42	100			100			LH/VIH45	100					
VIH43			100	100			LH/VIH46	100					
VIH45	100						LH/VIH47	60	40		50	50	
VIH46				100			LH/VIH49		100			100	
VIH47	95,2	4,8		100			LH/VIH50		100		100		
							LH/VIH51	100					
							LH/VIH52					100	
							LH/VIH53					100	
							LH/VIH56				100		

		Sang Total		Cellule	s Orophan	/ngées
	LMP1-WT	LMP1-	LMP1-	LMP1-WT	LMP1-	LMP1-
	(%)	del30 (%)	del69 (%)	(%)	del30 (%)	del69 (%)
LH2	64	36		100		
LH6		100				
LH7				100		
LH9				100		
LH10					100	
LH11	100				100	
LH14				100		

Tableau 11 : Tableau récapitulatif de tous les échantillons dans lesquels LMP1 a été amplifié et séquencé avec les proportions relatives de chaque variant détecté. Les pourcentages de chaque variant sont calculés par le logiciel AVA d'après les données du séquençage et vérifiés manuellement.

3. Fréquence des variants de LMP1

Par la suite, nous nous sommes intéressés à la fréquence de chacun des variants LMP1-WT, LMP1-del30 et LMP1-del69 dans les différentes populations et compartiments biologiques, ainsi qu'à la présence éventuelle de plusieurs de ces co-variants dans le même échantillon biologique (Tableau 12).

Compartiment biologique	Population	Fréquence LMP1-WT n (%)	Fréquence LMP1-del30 n (%)	Fréquence LMP1-del69 n (%)	Fréquence des co-variants n (%)	Nombre total d'échantillons LMP1+
Sang total	LH+/VIH+	18 (51,4)	23 (65,7)	2 (5,7)	8 (22,9)	35
	VIH+	13 (56,5)	13 (56,5)	2 (8,3)	4 (17,4)	24
	LH	2 (66,7)	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3
Cellules	LH+/VIH+	16 (69,6)	11 (47,8)	2 (8,7)	7 (30,4)	23
oropharyngées	VIH+	23 (65,7)	12 (34,3)	7 (20,0)	7 (20,0)	35
	LH	4 (66,7)	2 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	6

Tableau 12 :	Fréquence	des variant	s de LMP:	L dans les	différentes	populations	et compartime	ents
biologiques.								

La fréquence de détection est indiquée pour chaque variant LMP1-WT, LMP1-del30 et LMP1-del69 en fonction du compartiment biologique et de la population étudiée. La fréquence des co-variants représente le nombre d'échantillons cliniques dans lesquels au moins deux variants LMP1 WT et/ou LMP1-del30 et/ou LMP1-del69 sont détectés.

La fréquence du variant LMP1-WT varie de 51 à 70% en fonction de la population et du compartiment biologique, et celle du variant LMP1-del30 de 33 à 67%. Le variant LMP1-del69 a pu être séquencé dans 13 échantillons biologiques au total à des fréquences de 0 à 20%. La présence de co-variants LMP1-WT, LMP1-del30 ou LMP1-del69 a été détectée dans 27 échantillons à des fréquences de 0 à 33%, sans qu'une différence statistiquement significative ne soit observable entre les populations et les compartiments biologiques.

Dans les cellules oropharyngées des patients VIH+, la fréquence du variant LMP1-WT est significativement plus importante que celle du variant LMP1-del30 (p = 0,009). Dans les autres populations, les fréquences des variants LMP1-WT et LMP1-del30 ne diffèrent pas significativement, ni dans le sang total ni dans les cellules oropharyngées.

Quelle que soit la population étudiée, il semble que le variant LMP1-WT ait tendance à être plus fréquent dans les cellules oropharyngées que dans le sang total, alors que, à l'inverse, le variant LMP1-del30 parait plus souvent détecté dans le sang total qu'au niveau des cellules oropharyngées (tableau 12). Cependant, à ce niveau d'échantillonnage, les tests statistiques ne mettent pas en évidence de différence significative.

4. Comparaison des compartiments biologiques

LMP1 a pu être amplifié et séquencé à la fois dans le sang et les cellules oropharyngées de 16 patients LH/VIH, 22 patients VIH+ et 2 patients LH, soit 40 patients. Nous avons comparé la présence, dans ces deux compartiments biologiques, des variants LMP1-WT, LMP1-del30 et LMP1-del69 ainsi que leur polymorphisme (tableau 13).

	A	В	С	D	Total
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
LH+/VIH+	4 (25)	3 (18,8)	7 (43,8)	2 (12,4)	16
VIH+	10 (45,5)	4 (18,2)	6 (27,3)	2 (9)	22
LH	0 (0)	0 (0)	1 (50)	1 (50)	2
Total	14 (35)	7 (17,5)	14 (35)	5 (12,5)	40

Tableau 13 : Comparaison des compartiments biologiques

Les variants présents dans le sang total et les cellules oropharyngées d'un même patient ont été comparés et les patients ont été répartis en 4 catégories :

A : les variants de LMP1 présents dans le sang total et dans les cellules oropharyngées sont strictement identiques ou présentent moins de 2 mutations ponctuelles différentes

B : A + un des deux compartiments présente le même variant avec plus de polymorphisme (mutations ponctuelles supplémentaires)

C : A + un des deux ou les deux compartiments présentent l'un des autres co-variants LMP1-WT, LMP1-del30 ou LMP1-del69 avec éventuellement du polymorphisme

D : les variants de LMP1 présents dans le sang total et dans les cellules oropharyngées sont différents

			314	315	3	17	319		322		32	28	333	334	338	346	34	19	355	356	361	366	375
			Α	G	I	D	G		Q		E		D	Q	L	н	0)	G	D	Т	S	D
			Α	G		E			E/N/H		Q/	Ή		R	S					D	Т	T/A	Е
			168379	168376	168372	168370	168365	168357	168356	168355	168339	168337	168324	168320	168308	168285	168275	168274	168256	168253	168238	168225	168196
Catégorie	B95	5-8	Т	Α	G	Т	G	С	А	Α	G	Α	G	Α	Т	С	Α	Т	Т	Т	G	Т	С
		C-T						Α		Т				G	С	*	*	*	*			Α	
		Sgi								т				G	С	*	*	*	*			А	
A LH/VIH23 CO	60						Α		Т				G	С	*	*	*	*			Α		
	0								Т				G	С	*	*	*	*			А		
		SgT						Α		Т				G	С	*	*	*	*			Α	
								Α		Т				G	С	*	*	*	*			А	
	1/1/120							Α		Т	С			G	С	*	*	*	*			Α	
в	VIH28	CO									С				С	*	*	*	*			Α	
											С			G	С	*	*	*	*			Α	
														G	С	*	*	*	*			Α	
		SgT				Α		G					*	*	*	*	*	*	*		А	G	
c	111.6.0112					А		G					*	*	*	*	*	*	*		А	G	
C LH/VIH3	CO									С									С		Α		
						А		G												С		Α	
		SgT		С				Α		Т				G	С	*	*	*	*			Α	
D	LH/VIH50	0	С								С	С								С		A	A
		0									С	С								С		Α	Α

Figure 36 : Comparaison des compartiments biologiques - Exemples de patients entrant dans les catégories A, B, C, D du tableau 12. SgT : sang total, CO : cellules oropharyngées

Chez 14 patients (35,9%), exactement les mêmes variants de LMP1 ou des variants présentant seulement une ou deux mutations ponctuelles différentes sont observés dans les deux compartiments, comme pour le patient LH/VIH23 (catégorie A) (Figure 36). Sept patients (18,0%) possèdent les mêmes variants dans le sang total et dans les cellules oropharyngées, mais l'un de ces deux compartiments montre plus de polymorphisme (catégorie B). Par exemple, le patient VIH28 n'a qu'un seul variant LMP1-del30 dans le sang total. Ce même variant est détecté au niveau des cellules oropharyngées, avec 4 autres formes proches présentant d'autres mutations ponctuelles. Chez 13 patients (33,3%), le même variant peut être observé dans le sang total et les cellules oropharyngées, mais un des deux compartiments présente en plus un autre variant LMP1-WT, LMP1-del30 ou LMP1del69 avec plus ou moins de polymorphisme (catégorie C). Ainsi, le patient LH/VIH3 possède le même variant LMP1-del69 dans le sang total et les cellules oropharyngées. Ce variant est unique au niveau du compartiment sanguin, mais il est accompagné dans les cellules oropharyngées d'un variant LMP1-WT. Il est intéressant de noter que dans la majorité des cas (11/13, 84,6%), les variants communs aux deux compartiments sont les variants majoritaires (Tableau 14). Les 5 derniers patients montrent des variants différents entre les deux compartiments biologiques (catégorie D). C'est le cas pour le patient LH/VIH50 qui montre un variant LMP1-del30 dans le sang total et un variant LMP1-WT dans les cellules oropharyngées. Comparé à B95-8, ces deux variants présentent des profils de mutations ponctuelles bien différents et ne semblent pas avoir d'origine commune.

En comparant plus précisément la répartition des patients dans ces quatres catégories pour les populations LH/VIH et VIH+, il semble que la majorité des patients VIH+ présente les mêmes variants au niveau de la sphère oropharyngée et du sang total (cat A, 45,5%) alors que les patients de la cohorte Lymphovir présentent plus fréquemment des co-variants avec du polymorphisme (cat C, 43,8%). Il y aurait donc plus de polymorphisme chez les patients de la cohorte Lymphovir que dans la population contrôle VIH+. Mais encore une fois, à ce niveau d'échantillonnage, aucune différence statistiquement significative ne peut être mise en évidence.

		-			
	Sang Total	Cellules Oropharyngées		Sang Total	Cellules Oropharyngées
VIH3	100% LMP1-del30	84% LMP1-del30	LH/VIH3	100% LMP1-del69	96% LMP1-del69
		16% LMP1-del69			4% LMP1-WT
VIH7	100% LMP1-WT	25% LMP1-WT	LH/VIH11	98% LMP1-WT	100% LMP1-WT
		75% LMP1-del69		2% LMP1-del30	
VIH16	100% LMP1-WT	10%LMP1-WT	LH/VIH14	99,5% LMP1-WT	100% LMP1-WT
		90% LMP1-DEL69		0,5% LMP1-WT*	
VIH23	54% LMP1-del30	92% LMP1-del30	LH/VIH19	100% LMP1-WT	82% LMP1-WT
	46% LMP1-WT	8% LMP1-del69			18% LMP1-del30
VIH29	68% LMP1-del30	100% LMP1-del30	LH/VIH24	100% LMP1-del30	99% LMP1-del30
	32% LMP1-WT				1% LMP1-WT
VIH38	90% LMP1-del30	100% LMP1-del30	LH/VIH34	100% LMP1-del30	50% LMP1-del30
	10% LMP1-del69				50% LMP1-WT
LH2	64% LMP1-WT	100% LMP1-WT	LH/VIH41	100% LMP1-del30	97,5% LMP1-del30
	36% LMP1-del30				2,5% LMP1-WT
1			1		

Tableau 14 : Comparaison des compartiments biologiques – Détail des patients de la catégorie C

Description des variants présents dans chaque compartiment biologique des patients de la catégorie C, avec leur proportion relative. Les variants détectés à la fois dans le sang total et dans les cellules oropharyngées sont indiqués en gras.

5. Polymorphisme de LMP1

5.1. Souches d'EBV détectées

Les mutations les plus fréquemment observées dans le gène LMP1 sont 168 357 C/A associée à 168 355 A/T (correspondant à une mutation Q322N dans la séquence protéique), 168 357 C/G (Q322E), 168 320 A/G (Q334R), 168 308 T/C (L338S), 168 295 A/T (silencieuse), 168 266 A/G (H352R), 168 253 T/C (silencieuse), 168 238 G/A (silencieuse) et 168 225 T/A (S366T) (voir en annexe IV la liste des variants séquencés pour chaque patient et chaque compartiment biologique). Toutes ces mutations sont déjà connues et ont servi pour établir les différentes classifications des souches d'EBV, notamment celle d'Edwards (Edwards *et al.*, 1999) (Tableau 15). Les variants retrouvés dans nos échantillons cliniques appartiennent donc principalement aux souches B95-8, Med et China1, qui sont les souches les plus fréquemment décrites en Europe (tableau 2). La souche NC est également représentée dans cinq échantillons cliniques, dans le sang total du patient LH/VIH12 de la cohorte Lymphovir, dans le sang total du patient VIH45 et dans les cellules oropharyngées du patient VIH17 ainsi que dans le sang total et les cellules oropharyngées du patient VIH24. Aucun échantillon clinique ne présente de souche Alaskan.

	-																							
	314	317	322	326	327	328	331	334	335	338	342	344	345	346	349	352	353	354	355	356	357	358	361	366
B95-8	Α	D	Q	E	V	E	G	Q	G	L	G	G	G	Н	D	Н	G	G	G	D	Р	Н	Т	S
Med-			N	-	-			R		S						-			-			_		Т
Med+			Ν					R		S				-	-	-	-	-	-					Т
China1			Е					R		S				-/	-/	-/R	-/	-/	-/					T/A
China2							Q			Р		D												Т
China3										S				-	-	-	-	-	-					Т
Alaskan	1		К				А			Р			S					D	V					
NC			т				Q			Р					Ν							Р		

Tableau 15 : Comparaison des séquences protéiques des souches d'EBV.

Description des variations de séquence protéique des différentes souches d'EBV définies par Edwards (Edwards *et al.*, 1999). Med = souche méditerranéenne, NC = souche de Caroline du Nord. La souche China1 peut présenter ou non la délétion de 10aa en position 346-355.

Sur l'ensemble des échantillons cliniques, deux types de mutations sont fréquemment observées sur le codon 322 de LMP1, une substitution 168 357 C/G (Q322E) et l'association des substitutions 168 357 C/A et 168 355 A/T (Q322N), définissant respectivement l'appartenance à la souche China1 ou Méditerranéenne du variant. Au moins l'un de ces deux types de substitution peut être observé dans 78,5% des échantillons cliniques (99/126). Lorsque l'on détaille plus spécifiquement pour chaque variant la présence de ces mutations, sur 76 échantillons cliniques présentant un variant LMP1-WT, la substitution Q322E est significativement plus fréquemment observée (65,8%) que la substitution Q322N (14,4%) (p<0,0001) (Tableau 16). C'est le cas également pour le variant LMP1-del69, pour lequel est plus fréquemment retrouvée la substitution Q322E (69,2%) que Q322N (15,4%) (p=0,005). A l'inverse, le variant LMP1-del30 présente plus fréquemment une substitution Q322N (84,1%) que Q322E (20,6%) (p<0,0001). Les variants LMP1-del30 séquencés dans nos échantillons cliniques correspondraient donc majoritairement à des souches Méditerranéennes alors que les variants LMP1-WT et LMP1-del69 seraient majoritairement des souches China1.

	Fréquence de la substitution Q322N n (%)	Fréquence de la substitution Q322E n (%)	p-value	Nombre total d'échantillons cliniques présentant le variant
LMP1-WT	11 (14,4)	50 (65,8)	<0,0001	76
LMP1-del30	53 (84,1)	13 (20,6)	<0,0001	63
LMP1-del69	2 (15,4)	9 (69,2)	0,005	13

Tableau 16 : Etude du polymorphisme du codon 322 de LMP1

La p-value est calculée avec le test du Chi2.

L'étude du polymorphisme du codon 322 apporte également des informations à propos du variant LMP1-del69. Ce variant a été amplifié dans 13 échantillons cliniques. Dans trois d'entre eux (sang total du patient LH/VIH3, cellules oropharyngées des patients LH/VIH33 et VIH6), LMP1-del69 est l'unique variant observé et il présente systématiquement les substitutions Q322E et S366T ou S366A, définissant la souche China1. Dans un cas (patient VIH38), LMP1-del69 présente uniquement la substitution S366T, sans mutation au niveau du codon 322. Dans les 9 autres cas, LMP1-del69 est associé à un autre variant et présente systématiquement la même mutation sur le codon 322 que l'autre variant présent dans le même échantillon clinique. Ces données suggèrent que la délétion de 69pb dériverait d'un autre variant présent dans le même compartiment biologique, apparaissant par recombinaison homologue au moment d'une phase de réplication virale, comme c'est le cas pour la délétion de 30pb (Sandvej *et al.*, 1994).

5.2. Mutations ponctuelles

Parmi tous les échantillons cliniques, dans la partie C-terminale de LMP1 séquencée, la technique de séquençage nouvelle génération nous a permis d'identifier 85 mutations ponctuelles, conduisant à des variations de séquence protéique dans 74 cas (tableau 17). Parmi ces mutations, 37 substitutions n'étaient pas encore décrites dans la littérature. Si la plupart de ces substitutions ne sont retrouvées que dans un seul échantillon clinique, certaines ont pu être mises en évidence à la fois dans le sang et les cellules oropharyngées d'un même patient. C'est le cas pour les substitutions G319D et G335V chez le patient VIH22, la substitution Q322H chez le patient LH/VIH23, les substitutions E326Q et E326D chez le patient LH/VIH11 et la substitution D373Y chez le patient LH/VIH41.

Une mutation particulière, 168339 G/C, correspondant à une substitution E328Q, a été détectée dans 28 échantillons cliniques, parmi lesquels le sang total et les cellules oropharyngées des patients LH/VIH14, LH/VIH32, LH/VIH47, VIH10, VIH18 et LH2. Cette mutation est retrouvée sur un variant LMP1-WT dans 25 des 28 prélèvements (89,3%) et sur un variant LMP1-del30 dans 7 des 28 prélèvements (25,0%), les variants LMP1-WT et LMP1-del30 étant présents dans le même échantillon clinique dans 5 cas. Elle est donc plus fréquemment associée au variant LMP1-WT qu'au variant LMP1-del30 (p=0,000001).

Parmi les substitutions détectées dans nos échantillons cliniques, 24 touchent le domaine effecteur CTAR2 de LMP1 (351-386). Elles pourraient donc être responsables d'un changement d'activité de LMP1, interférant dans sa liaison avec des partenaires impliqués dans les voies de signalisation cellulaire.

Tableau 17 : Mutations ponctuelles identifiées dans la partie C-terminale de LMP1

substitution du nucléotide par rapport à B95-8	variation dans la séquence protéique	statut	substitution du nucléotide par rapport à B95-8	variation dans la séquence protéique
168381 G/T	A314S		168304 G/A	M339I
168379 T/C	silencieuse		168295 A/T	silencieuse
168376 A/C	silencieuse		168291 G/A	G344S
168372 G/A	D317N		168283 T/C	silencieuse
168370 T/A	D317E	connu	168279 C/A	H348N
168369 G/C	G318R		168279 C/G	H348D
168367 A/C	silencieuse		168277 T/G	H348Q
168365 G/A	G319D		168276 G/A	D349N
168359 C/T	P321L		168275 A/C	D349A
168357 C/A+ 168355 A/T	Q322N	connu	168275 A/G	D349G
168357 C/A	Q322K	connu	168270 G/A	G351S
168357 C/A+ 168356 A/C	Q322T	connu	168267 C/A	H352N
168357 C/G	Q322E	connu	168266 A/G	H352R
168357 C/G + 168356 A/C	Q322A		168263 G/A	G353D
168357 C/G + 168356 A/G	Q322G		168258 G/A + 168257 G/T	G355I
168357 C/G + 168355 A/C	Q322D	connu	168258 G/T	G355C
168357 C/G + 168355 A/T	Q322D	connu	168255 G/A	D356N
168355 A/T	Q322H		168254 A/G	D356G
168350 C/T	T324M	connu	168254 A/G + 168253 T/C	D356G
168345 G/C	E326Q		168253 T/C	silencieuse
168343 G/C	E326D		168252 C/T	P357S
168341 T/C	V327A		168250 A/G	silencieuse
168340 T/G	silencieuse		168248 A/C	H358P
168339 G/C	E328Q		168245 T/G	L359R
168339 G/C + 168337 A/C	E328H		168245 T/A	L359H
168337 A/C	E328D		168242 C/T	P360L
168333 A/C	K330Q		168239 C/T	T361S
168333 A/G	K330E		168238 G/A	silencieuse
168332 A/C	K330T		168226 T/G	silencieuse
168331 A/T	K330N		168225 T/A	\$366T
168330 G/C + 168329 G/A	G331Q	connu	168225 T/G	\$366A
168329 G/A	G331E		168 225 T/A + 168224 C/A	S366N
168329 G/C	G331A	connu	168211 T/C	silencieuse
168324 G/C	D333H	connu	168204 G/T	D373Y
168323 A/C	D333A		168197 A/G	D375G
168320 A/G	Q334R	connu	168196 C/A	D375E
168320 A/G + 168319 G/T	Q334R	connu	168193 C/T	silencieuse
168318 G/A	G335S	connu	168193 C/A	silencieuse
168317 G/T	G335V		168192 C/A	H377N
168317 G/A + 168316 C/G	G335E		168183 G/A	V380I
168316 C/G	silencieuse		168180 C/A	Q381K
168315 C/T	P336S		Ce tableau regroupe	toutes l
168309 T/C + 168308 T/C	L338P	connu	ponctuelles détectées l	ors du sé
168309 T/A + 168308 T/C	L338T	connu	échantillons cliniques	aver
168308 T/C	L338S	connu	correspondente au pivoa	uvec i de la cóqui
168308 T/C + 168307 G/A	L338Y			
168307 G/C	L338F			e de droite e

utes les mutations du séquençage des ivec la variation la séquence protéique droite est indiqué si la — mutation a déjà été décrite dans des publications

(Berger et al., 1999; Edwards, Seillier-Moiseiwitsch, and Raab-Traub, 1999; Edwards et al., 2004; Guidoboni et al., 2005; Hadhri-Guiga et al., 2006; Knecht et al., 1993; Rothenberger et al., 1997; Saechan et al., 2010; Walling et al., 1999).

statut

connu

III. Analyse des données cliniques

Un des objectifs de mon travail de thèse était de confronter la présence des variants de LMP1 aux données cliniques des patients de la cohorte Lymphovir et de la population contrôle VIH+ afin de déterminer si les variants délétés dans la partie C-terminale de LMP1 peuvent être considérés comme des facteurs aggravants ou de mauvais pronostic dans les LH.

1. Analyse des paramètres cliniques en fonction de la présence des variants LMP1

Le tableau 18 regroupe toutes les données cliniques des patients de la cohorte Lymphovir et de la population contrôle VIH+ pour lesquels LMP1 a pu être amplifiés par PCR dans le sang total. Le sexe-ratio, la moyenne d'âge, la charge virale VIH et la durée d'infection par le VIH sont comparables pour les deux populations. En revanche, le taux de lymphocytes CD4 et la charge virale sanguine EBV semblent plus bas pour les patients de la cohorte Lymphovir que pour la population contrôle VIH+.

	cohorte LYMPHOVIR	population contrôle
	LH+/VIH+ (n=35)	VIH+ (n=24)
Sexe		
hommes	29 (82,9%)	17 (70,8%)
femmes	6 (17,1%)	7 (29,2%)
Age médian (ans)	44 (32-61)	45 (19-53)
CV VIH médiane	40 (12-413586)	20 (20-103700)
Taux CD4+ médian (cellules/mm ³)	380 (50-1120)	640 (230-1130)
Durée médiane d'infection par le VIH (mois)	187 (0-312)	150 (4-258)
CV EBV médiane dans le sang total (copies/ml)	3155 (0-60000)	5733 (0-159300)
CV EBV médiane dans le plasma (copies/ml)	320 (0-21900)	
CV EBV dans les cellules oropharyngées (copies/capillaire)		1224 (0-521000)
Co-infections		
CMV+		22 (91,7%)
VHC+		5 (20,8%)
toxo+		13 (54,2%)
Stade SIDA		
non	26 (74,3%)	
oui	9 (25,7%)	
Stade LH *		
I-II	8 (23,5%)	
III-IV	26 (76,5%)	

Tableau 18 : Caractéristiques cliniques des patients de la cohorte Lymphovir et de la population con	trôle
VIH+.	

Dans ce tableau sont considérés uniquement les patients montrant une amplification de LMP1 par PCR dans le sang total. Entre parenthèse sont indiqués soit un pourcentage, soit les valeurs minimales et maximales du critère décrit (*une donnée manquante).

Les différents paramètres cliniques ont ensuite été soumis à des analyses univariées dans le but de mettre en évidence si la présence de LMP1 sauvage ou d'un variant LMP1 délété en Cterminal (LMP1-del30 ou LMP1-del69) pouvait être associé à un de ces facteurs cliniques (tableau 19 et 20). Pour des raisons d'effectifs, les variants LMP1-del30 et LMP1-del69 ont été regroupés lors des analyses statistiques. Les données de la cohorte Lymphovir ont été analysées par Rémi Lancar et Dominique Costagliola (INSERM U943, Paris) avec un test exact de Fisher, tandis que nous avons analysé les données de la population contrôle VIH+ avec le test du Chi2.

De nombreux critères cliniques ont été pris en compte au moment du diagnostic du LH, l'âge et le sexe des patients, le taux de lymphocytes CD4, la charge virale VIH ainsi que la charge virale EBV sanguine et plasmatique, la durée d'infection par le VIH, le fait d'être en stade SIDA ou non et le stade du LH. Avec un seuil de significativité à 10%, les analyses multivariées mettent en évidence que, dans la population LH/VIH de la cohorte Lymphovir, lorsque le taux de CD4 est inférieur à 100 cellules/mm³, il est plus probable que l'on détecte dans le sang du patient le variant LMP1-WT qu'un variant délété, avec un odd ratio de 6,8 (tableau 20). Dans la population contrôle VIH+, tous les patients ont un taux de CD4 supérieur à 100 cellules/mm³. En plaçant le seuil à la médiane, 640 cellules/mm³, il semblerait que le variant LMP1-WT soit plus fréquent chez les patients ayant un taux de CD4 supérieur à 640 cellules/mm³ et que les variants délétés soient plus fréquemment détectés chez les patients ayant des CD4 inférieurs à 640 cellules/mm³ (p=0,015). Les autres paramètres cliniques ne montrent pas de corrélation significative avec la présence d'un variant LMP1-WT ou délété.

	Population contrôle VIH+					
VariableLMP1-del30 ou LMP1- del69 (N=21)LMP1-WT (N=14)Test exact de FisherLMP1-del30 ou LMP1- del69 (N=13)LMP1- del69	WT Test du 1) Chi2					
Sexe p=0,66	p=0,85					
F 3 3 F 4 3						
H 18 11 H 9 8						
Age (ans) p=0,68	p=0,47					
<u>≤49</u> 17 10 <u>≤49</u> 11 8						
≥ 50 4 4 ≥ 50 2 3						
(cellules/mm3)	p=0,015					
≥100 20 10 ≥640 3 8						
<100 0 3 <640 10 3						
Charge virale p=0,19	p=0,37					
(copies/ml) ≤200 19 10 ≤200 12 10						
>200 2 4 >200 1 0						
Durée d'infection p=1 VIH**	p=0,41					
(ans) ≥ 5 16 11 ≥ 5 8 9						
<5 5 3 <5 4 2						
Stade Sida p=0,26						
Non 14 12						
Oui 7 2						
Stade LH** p=0,42						
(V/EBV/capg	n-0.72					
(conjes/ml) <3000 10 7 <3000 5 5	μ=0,75					
>3000 11 7 >3000 8 6						
CV EBV p=1						
(copies/mi) 500 12 /						

Tableau 19 : Facteurs pronostiques de la présence d'un variant LMP1 sauvage ou délété

Analyses univariées * : Deux valeurs manquantes, ** : Une valeur manquante, *** : Six valeurs manquantes

Tableau 20 : Corrélation entre le taux de CD4 et le variant LMP1-WT dans la cohorte Lymphovir

Variable		N	LMP1-WT	OR	IC	Test
Taux de CD4						p=0,05
(cellules/mm3)	≥100	30	10	1		
	<100	3	3	6,8	[1,0 ; +∞]	

Analyses multivariées, régression logistique exacte. OR : odd ratio, IC : intervalle de confiance

2. Analyse des paramètres cliniques en fonction de la charge virale EBV sanguine ou plasmatique

Nous nous sommes également intéressés à savoir si l'un des facteurs cliniques pouvait être relié aux charges virales EBV sanguines ou plasmatiques chez les patients de la cohorte Lymphovir (tableau 21 et 22). Avec un seuil de significativité à 10% à partir des analyses univariées, aucun des critères étudiés ne semble être spécifiquement corrélé à la charge virale EBV. Etant donné notre faible effectif, un seuil de significativité placé à 20% ne permet pas non plus d'obtenir des valeurs de p significatives en analyse multivariée avec le sexe et l'âge des patients en fonction de la charge virale EBV sanguine, ni avec le stade SIDA et le stade de LH en fonction de la charge virale plasmatique.

Variable		CV ≤3000	CV >3000	Test exact
		copies/ml (N=17)	copies/ml (N=18)	de Fisher
Sexe				p=0,18
	F	1	5	
	Н	16	13	
Age (ans)				p=0,12
	<=49	11	16	
	≥50	6	2	
Taux de CD4*				p=0,60
(cellules/mm3)	≥100	16	14	
	<100	1	2	
Charge virale VIH				p=0,66
(copies/ml)	≤200	15	14	
	>200	2	4	
Durée d'infection VIH				p=0,44
(ans)	≥5	12	15	
	<5	5	3	
Stade Sida				p=0,44
	Non	14	12	
	Oui	3	6	
Stade LH**				p=0,69
	1-11	5	3	
	III-IV	12	14	

Tableau 21 : Facteurs pronostiques en fonction de la charge virale EBV dans le sang total

Analyses univariées, * : deux valeurs manquantes, ** : une valeur manquante, CV : charge virale

Variable		CV ≤600	CV > 600	Test ±
- Covo				n_1
Sexe	_	2		b=1
	F	3	1	
	Н	16	9	
Age				p=0,63
	≤49 ans	14	9	
	≥50 ans	5	1	
Taux de CD4*				p=1
(cellules/mm3)	≥100	17	8	
	<100	1	1	
Charge virale VIH				p=0,57
(copies/ml)	≤200	16	8	
	>200	3	2	
Durée d'infection VIH				p=1
(ans)	≥5	14	8	
	<5	5	2	
Stade Sida				p=0,19
	Non	16	6	
	Oui	3	4	
Stade LH**				p=0,20
	1-11	7	1	
	III-IV	12	9	

Tableau 22 : Facteurs pronostiques en fonction de la charge virale EBV plasmatique

Analyses univariées * : Deux valeurs manquantes, \pm : Test exact de Fisher, CV : charge virale

DISCUSSION

Pour l'étude de nos échantillons cliniques, nous avons utilisé une technique de séquençage nouvelle génération (NGS - Next Generation Sequencing), le GS Junior, basée sur la technologie de pyroséquençage 454. Dans un premier temps, la fiabilité et la sensibilité du séquenceur ont été testées sur 6 échantillons composés de mélanges de plasmides pRT-LMP1-WT, pRT-LMP1-del30 et pRT-LMP1-del69 en différentes proportions. Cela nous a permis de montrer que la proportion de chaque variant présente dans les échantillons cliniques est respectée lors de l'amplification par nested-PCR et du séquençage. Avec seulement 6 échantillons cliniques testés, il n'est pas possible d'affirmer que cette technique est quantitative. Pour cela, il faudrait renouveler le test avec un plus grand nombre d'échantillons et faire des tests de répétabilité. Néanmoins, nous avons montré qu'il y a une très bonne corrélation entre les pourcentages théoriques de chaque variants mélangés dans nos échantillons tests et les pourcentages calculés lors du séquençage. Par ailleurs, la meilleure sensibilité que nous avons obtenue pour la détection des variants est de 0,5%. La sensibilité est directement définie par le cut-off choisi et le nombre d'échantillons mélangés lors du séquençage. Etant donné qu'une réaction de séquençage fourni entre 50 000 et 80 000 séquences, nous aurions pu obtenir une meilleure sensibilité en diminuant le nombre d'échantillons cliniques séquencés par réaction, pour obtenir plus de séquences pour chacun des échantillons cliniques. Chaque réaction de séquençage coutant environ 1000€, il nous a fallu trouver le bon équilibre entre la profondeur de séquençage désirée et le coût total de l'étude. Nous avons choisi de mélanger 30 à 50 échantillons par réaction de séquençage, dans le but d'obtenir environ 1000 séquences par échantillon. En fixant un cut-off de 10 séquences, cela nous permettait de viser une sensibilité moyenne de 1%.

Les techniques de NGS étant très récentes, l'analyse des séquences n'est pas encore standardisée, le choix des logiciels et du cut-off est laissé à l'appréciation de chaque équipe, avec de grandes variations possibles. Par exemple, une équipe polonaise a récemment utilisé la technologie de séquençage 454 pour séquencer la région hypervariable 1 du virus de l'hépatite C, en comparant plusieurs techniques d'analyse des séquences. Un cut-off placé à 1% des séquences a permis d'identifier seulement 8 haplotypes, certains variants présentant plus de 100 séquences n'étant pas pris en compte car représentant moins de 1%. Tandis qu'un cut-off de 5 séquences a permis d'identifier 333 haplotypes avec une fréquence variant de 10 à 0,13% (Caraballo Cortes *et al.,* 2013).
Nous avons observé une prévalence de LMP1 de 63,6% dans le sang total des patients LH/VIH+, 51,1% chez les patients VIH+ et 21,4% chez les patients ayant un LH. Ces valeurs sont plus basses que celles décrites dans les études suisse, espagnole et italienne s'intéressant au LH chez des patients VIH+ (97,6%) ou dans leurs populations contrôles VIH+ (94-95%) (tableau 6) (Dolcetti et al., 1997; Santon et al., 1995; Zuercher et al., 2012). En revanche, ces études décrivent des biopsies positives pour EBV dans 91 à 94% des cas, fréquence équivalente à celle de la cohorte Lymphovir pour laquelle le marquage immunohistochimique de EBER et LMP1 montre que 42 des 44 échantillons analysés sont EBV+ (95%).

Dans notre étude, LMP1 a été plus souvent détecté dans les cellules oropharyngées des patients VIH+ (74,5%) que des patients LH/VIH+ (51,1%) et LH (42,9%). On observe également dans la population contrôle VIH+, mais pas dans les deux autres populations, que la prévalence de LMP1 est plus importante dans les cellules oropharyngées que dans le sang total. Il est connu qu'EBV est plus fréquemment détecté par PCR dans la salive des patients VIH+ que dans la population générale VIH- (80% VS 20%) (Amornthatree *et al.,* 2012). Chez les patients LH/VIH+, l'immunosuppression due au LH diminue probablement le nombre de cellules immunitaire portant EBV au niveau de la sphère oropharyngée, expliquant une plus faible détection de LMP1 que dans la population contrôle VIH+. Cette fréquence élevée d'EBV dans la sphère oropharyngée n'est pas corrélée avec une plus grande fréquence de détection de co-variants.

Nous n'avons pas mis en évidence une très forte prévalence du variant LMP1-del30 dans la population des patients ayant un LH associé au VIH comme les études italienne et espagnole (83,3%, 100%). Cependant ces études ont été réalisées sur de l'ADN extrait de biopsies alors que nous avons analysé la présence des variants de LMP1 dans le sang total et les cellules oropharyngées. Il sera intéressant d'analyser la présence des variants de LMP1 au niveau de la biopsie pour les patients de la cohorte Lymphovir et de la population contrôle LH afin de voir quel variant est détecté au niveau des cellules tumorales et de voir si la prévalence des variants délétés de LMP1 est effectivement plus importante que celle du sang total et des cellules oropharyngées.

Sur l'ensemble des populations étudiées, le variant LMP1-WT semble plus fréquent que LMP1-del30 au niveau de la sphère oropharyngée, même si la différence n'est significative que dans la sphère oropharyngée des patients VIH+. A l'inverse, le variant LMP1-del30 semble plus fréquent que LMP1-WT dans le sang total, sans que la différence ne soit statistiquement significative. Plusieurs études ont montré que des individus peuvent être infectés avec plusieurs variants d'EBV. Ces variants ne sont pas présents dans les mêmes proportions dans la sphère oropharyngée et le sang périphérique et leur détection ainsi que leur proportion est variable dans le temps (Fafi-Kremer *et al.*,

2005b; Sitki-Green *et al.*, 2003). Il est possible que les variants de LMP1 sauvage ou délétés aient un tropisme cellulaire différent. Chez des patients infectés par des souches sauvages et où l'EBV se réplique au niveau de la sphère oropharyngée, des variants délétés dans la partie c-terminale de LMP1 émergent parfois, par recombinaison homologue (Sandvej *et al.*, 1994). Ces variants pourraient avoir plus tendance à infecter les lymphocytes B et à passer dans le sang circulant que la souche sauvage. Cela expliquerait que l'on retrouve plus fréquemment le variant LMP1-del30 dans le sang périphérique et le variant LMP1-WT dans les cellules oropharyngées.

Sur l'ensemble des échantillons cliniques, nous avons obtenu une amplification de LMP1 à la fois dans les cellules oropharyngées et le sang total pour 40 patients. Lorsque l'on compare la présence des variants entre ces deux compartiments, même si la différence n'est pas statistiquement significative, il semble que les patients de la cohorte Lymphovir présentent plus souvent des variants différents entre le sang total et les cellules oropharyngées, accompagné de plus de polymorphisme (tableau 12, catégorie C 43,8%), que les patients VIH+ chez qui, la plupart du temps, exactement les mêmes variants sont détectés dans le sang et la sphère oropharyngée (tableau 12, catégorie A 45,5%).

Les variants de LMP1 détectés dans nos échantillons cliniques appartiennent aux souches B95-8, Méditerranéenne et China1, qui sont les souches majoritairement présentes en Europe. Quelques patients présentent également des souches North Carolina. Notre travail a permis d'identifier 85 mutations ponctuelles dans le gène BNLF1 par rapport à la séquence de référence B95-8, dont 37 substitutions non encore décrites jusqu'alors. La plupart d'entre elles ne sont retrouvées que dans un seul échantillon clinique. Afin d'exclure la possibilité d'une erreur de réplication de la polymérase au moment de la nested-PCR, nous avons utilisé une polymérase spécialement haute fidélité, avec un taux d'erreur de 4,4x10⁻⁷pb. Toutes les séquences ont été vérifiées manuellement et seules les mutations « plausibles » ont été conservées, après vérification des graphiques d'incorporation des nucléotides. Les séquences suspectes ont été reséquencées dans la mesure du possible. Certaines de ces substitutions ont été retrouvées à la fois dans le sang total et dans les cellules oropharyngées d'un même patient, échantillons qui ont toujours été amplifiés par PCR et séquencés dans des expériences indépendantes pour limiter le risque de contamination des échantillons. Cela permet de confirmer que ces mutations ponctuelles existent bel et bien et ne sont pas des erreurs de réplication de la polymérase ni des erreurs de séquençage. Une substitution en particulier a été observée dans 28 échantillons cliniques, 168339 G/C (E328Q), particulièrement associée au variant LMP1-WT. Vingt quatre des substitutions décrites sont dans le domaine effecteur CTAR2 de LMP1 (351-386). Il est possible que cela impacte l'activité de LMP1 en interférant dans sa

liaison avec ses partenaires cellulaires, perturbant ainsi l'activation de différentes voies de signalisation.

Parmi les 62 patients LH/VIH+ recrutés dans la cohorte Lymphovir à ce jour, 4 ont vu leur LH récidiver. Nous avons obtenu le sang et les cellules oropharyngées d'un de ces patients au moment de son diagnostic initial puis lors de sa récidive. L'amplification de LMP1 dans ces 4 échantillons cliniques était négative. Pour les 3 autres patients, nous avons analysé les échantillons cliniques du diagnostic initial. Dans le sang total, LMP1-WT a été détecté chez l'un des patients, LMP1-del30 chez un autre, et le dernier patient était infecté à la fois avec LMP1-WT et LMP1-del30. Deux échantillons de cellules oropharyngées étaient disponibles pour ces 3 patients, pour lesquels l'amplification de LMP1 était négative. Il sera intéressant de faire l'amplification et le séquençage de LMP1 dans les échantillons cliniques prélevés au moment de la récidive afin de comparer avec les variants présents au moment du diagnostic initial. Une étude française s'est intéressée à comparer la présence d'EBV lors du diagnostic et des rechutes du LH. Pour deux patients ayant développé un LH puis ayant fait une ou deux récidives par la suite, LMP1 séquencé dans la tumeur était identique au moment du diagnostic initial et des récidives (Brousset *et al.*, 1994).

Afin de déterminer si une corrélation peut être établie entre la présence d'un variant délété et le développement d'un LH plus agressif ou de mauvais pronostic, nous avons confronté les données cliniques des patients de la cohorte Lymphovir et de la population contrôle VIH+ aux résultats de séquençage. Dans la population LH/VIH+, les analyses multivariées montrent que, pour les patients ayant un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 100 cellules/mm³, la probabilité de détecter un variant LMP1-WT est plus forte que de trouver un variant LMP1 délété, avec un odd-ratio de 6,8. A l'inverse, dans la population VIH+, le variant LMP1-WT est plus fréquemment détecté chez les patients ayant un taux de lymphocytes CD4 supérieur à 640 cellules/mm³ et les variants LMP1 délétés sont plus fréquemment détectés chez les patients ayant un taux de lymphocytes CD4 inférieur à 640 cellules/mm³. Cette observation de la prévalence des variants en fonction du taux de lymphocytes CD4 semble a priori contradictoire. Pourtant, si la plupart des pathologies associées au SIDA se développent lors des phases d'immunosuppression sévères, l'incidence des lymphomes de Hodgkin semble plus faible chez les personnes ayant une immunodépression sévère que chez les personnes présentant une légère immunodépression (Biggar et al., 2006). En effet, le développement d'un LH requiert la présence d'un minimum de cellules immunitaires, qui communiquent avec les cellules tumorales HRS et participent à leur croissance et leur survie. Ainsi, la prévalence des variants LMP1 délétés est la plus forte lors des immunosuppressions modérées, lors desquelles le risque de développer un LH est maximum pour les patients VIH+. A l'inverse, la prévalence du variant LMP1 sauvage est plus importante chez les patients montrant une forte immunosuppression ou chez les patients ayant un taux de CD4 normal, situations dans lesquelles le risque de développer un LH est moindre. Cela laisse penser que la présence d'un variant LMP1 délété pourrait être un facteur de risque de développer un LH.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Afin d'étudier l'implication des variants de LMP1 dans le développement du LH, nous avons développé deux approches complémentaires, l'une clinique et l'autre fondamentale. L'amplification et le séquençage de LMP1 dans les échantillons de sang total et de cellules oropharyngées de la cohorte Lymphovir (LH/VIH+) et de deux populations contrôles (VIH+ et LH) nous a permis de comparer la fréquence des variants de LMP1 dans ces populations et dans les différents échantillons biologiques. Parallèlement, nous avons développé un modèle cellulaire dérivé de LH exprimant LMP1 de façon inductible dans le but de caractériser l'impact des variants de LMP1 sur l'expression des cytokines et la progression du cycle cellulaire, deux mécanismes intrinsèquement liés à la promotion de la survie des cellules tumorales.

L'amplification et le séquençage des variants de LMP1 dans tous les échantillons cliniques a montré que les variants LMP1-WT et LMP1-del30 pourraient avoir des tropismes cellulaires différents, le premier étant plus fréquent au niveau de la sphère oropharyngée et le second étant plus fréquent dans le sang périphérique. De plus, contrairement aux patients VIH+ qui présentent la plupart du temps les mêmes variants de LMP1 au niveau de la sphère oropharyngée et du sang périphérique, les patients LH/VIH+ ont montré fréquemment la présence de covariants dans l'un ou l'autre des deux compartiments biologiques, associée à un plus grand polymorphisme. Par ailleurs, le séquençage de LMP1, avec la technique de séquençage nouvelle génération du GS Junior, nous a permis d'identifier 87 mutations ponctuelles dans la partie C-terminale de LMP1, parmi lesquelles 67 n'étaient pas encore décrites et 24 touchent le domaine effecteur CTAR2 de LMP1, perturbant potentiellement l'activité de LMP1. Enfin, l'analyse des données cliniques a révélé que la forme LMP1-WT est plus fréquemment détectée chez les patients très fortement immunodéprimés ou, au contraire, ayant un taux de lymphocytes CD4+ normal, situations dans lesquelles l'incidence des LH est la plus faible. Tandis que le variant LMP1-del30 est plus fréquemment détecté chez les patients présentant une immunosuppression modérée, période où l'incidence des LH est la plus forte.

Dans la lignée cellulaire KMH2, dérivée d'un LH, nous avons mis en évidence que tous les variants de LMP1 induisent l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , le TNF- β , l'IL-6, RANTES/CCL5 et l'IFN- γ , créant un microenvironnement inflammatoire destiné à favoriser le développement tumoral. Il est intéressant de noter que le variant LMP1-del30 induit l'expression de l'IFN- γ , l'IL-6 et le TNF- β à un taux significativement plus faible que LMP1-WT et LMP1-del69, alors que LMP1-del69 stimule plus fortement l'expression de l'IL-6 et RANTES/CCL5. Etant donné que l'IFN- γ est impliqué dans la réponse antivirale contre les cellules infectées par l'EBV, réduire l'expression

de l'IFN-γ pourrait être un mécanisme développé par LMP1-del30 afin d'échapper au système immunitaire. Au contraire, la forte induction de l'expression de cytokines pro-inflammatoires par LMP1-del69 pourrait entrainer la reconnaissance et la destruction par le système immunitaire des cellules infectées, expliquant la faible fréquence de ce variant *in vivo*. Par ailleurs, nous avons observé que l'expression de LMP1 impacte la progression du cycle cellulaire. Tous les variants causent une baisse du pourcentage de cellules en phase S, LMP1-del30 dans une plus forte mesure que les deux autres variants. Alors que LMP1-WT provoque une accumulation de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire, LMP1-del30 augmente le pourcentage de cellules en phase G0/G1. Ces différences entre les variants reflètent des propriétés oncogéniques différentes, impactant potentiellement le développement des LH.

Les études cliniques et fondamentales vont toutes deux dans le sens d'une plus grande oncogénicité du variant LMP1-del30, qui apparaît donc bien comme un facteur de risque de développer un LH. En revanche, cela ne semble pas être le cas du variant LMP1-del69. Sachant que le risque de développer un LH est augmenté d'un facteur 20 pour les personnes VIH+, que le variant LMP1-del30 a un pouvoir tumorigène accru et est un facteur de risque potentiel associé au développement du LH, il serait intéressant de rechercher la présence des variants LMP1 par séquençage chez les patients VIH+. Cela permettrait aux cliniciens de surveiller plus attentivement le développement possible d'un LH chez les personnes infectées par un variant d'EBV avec une protéine LMP1-del30 et de les prendre en charge plus précocement.

Les conclusions de ce travail seront complétées par l'amplification et le séquençage de LMP1 au niveau du tissu tumoral, pour les patients de la cohorte Lymphovir LH/VIH+ et de la population contrôle LH, afin de déterminer quel variant est réellement impliqué dans le développement de la tumeur et comparer aux variants détectés dans les autres compartiments biologiques. L'étude des variants de LMP1 est souvent réalisée à partir d'une biopsie de la tumeur ou d'un prélèvement sanguin. Afin d'observer la fréquence des variants dans la population générale de porteurs sains, des prélèvements salivaires non invasifs sont généralement réalisés. Notre étude est originale en cela que c'est la première fois que sera comparée, chez les mêmes patients, la présence des variants de LMP1 dans la biopsie, dans le sang périphérique et dans la sphère oropharyngée. En effet, des biopsies ont été réalisées chez les patients de la cohorte Lymphovir, dont une partie a servi à faire des coupes histologiques avec des marquages immunologiques dans le cadre diagnostic du LH, et l'autre partie a été congelée pour les études des différentes équipes de recherche impliquées dans la cohorte Lymphovir. Les biopsies sont pour l'instant centralisées à Paris et seront bientôt envoyées aux différents centres de recherche pour être analysées. A Grenoble, des biopsies ont également été réalisées pour le diagnostic des patients de la population contrôle LH. Ces prélèvements sont conservés dans une tissuthèque au Centre de Recherches Biologiques du CHU. Nous ferons l'amplification et le séquençage de LMP1 sur l'ADN extrait de ces biopsies afin de déterminer quel variant est retrouvé au niveau du tissu tumoral et participe au développement du LH. Nous comparerons ces résultats aux variants détectés dans les autres compartiments biologiques. Par ailleurs, une population contrôle de patients VIH+ sans lymphome est en cours de recrutement à Paris, appariée aux patients de la cohorte Lymphovir selon des critères de sexe, âge, taux de lymphocytes CD4 et charge virale VIH. Nous séquencerons également LMP1 dans le sang total et les cellules oropharyngées de ces patients.

Les techniques habituelles d'étude de l'ADN viral dans les biopsies consistent à rechercher LMP1 dans l'ADN total extrait de matériel congelé. Les séquences de LMP1 amplifiées et séquencées correspondent alors aux clones d'EBV présents dans le tissu tumoral, aussi bien dans les cellules HRS que dans les lymphocytes environnants. Pour notre étude de LMP1 dans le tissu tumoral, une nouvelle technique est envisagée, la microdissection au laser, qui permet de découper précisément des cellules uniques dans une coupe tissulaire. Il est possible de cibler soit les cellules HRS grâce à un marquage du CD30, soit les lymphocytes environnants EBV+ avec une hybridation *in situ* anti-EBER. L'EBV étant clonal dans toutes les cellules tumorales, une centaine de cellules sont découpées puis déposées dans un tube de PCR afin d'amplifier LMP1. Cela permettra d'amplifier spécifiquement LMP1 dans les cellules tumorales HRS (Garcia-Cosio *et al.*, 2008).

Etant donné l'importance des cytokines aussi bien dans le développement du LH que dans la physiopathologie de l'infection à VIH, la mesure du taux de cytokines présentes dans le plasma des patients VIH+ développant un LH permettrait de mettre en évidence une éventuelle corrélation entre le taux de cytokines et la présence d'un variant LMP1 en particulier. D'autre part, il serait intéressant de cloner dans le vecteur pRT-LMP1 les variants détectés par séquençage dans les échantillons cliniques et portant des mutations ponctuelles dans le domaine CTAR2 de LMP1, qui est largement impliqué dans l'activation de nombreuses cytokines. L'établissement de nouvelles lignées cellulaires KMH2 avec ces variants permettrait de voir l'impact de ces mutations sur la sécrétion de cytokines et de déterminer lesquelles sont favorables ou défavorables dans le cadre d'un LH.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Accardi, R., Fathallah, I., Gruffat, H., Mariggio, G., Le Calvez-Kelm, F., Voegele, C., Bartosch, B., Hernandez-Vargas, H., McKay, J., Sylla, B. S., Manet, E., and Tommasino, M. (2013). Epstein -Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein DeltaNp73alpha. *PLoS Pathog* **9**(3), e1003186.
- Adler, B., Schaadt, E., Kempkes, B., Zimber-Strobl, U., Baier, B., and Bornkamm, G. W. (2002). Control of Epstein-Barr virus reactivation by activated CD40 and viral latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1), 437-42.
- Aho, S., Buisson, M., Pajunen, T., Ryoo, Y. W., Giot, J. F., Gruffat, H., Sergeant, A., and Uitto, J. (2000). Ubinuclein, a novel nuclear protein interacting with cellular and viral transcription factors. J Cell Biol 148(6), 1165-76.
- Aho, S., Lupo, J., Coly, P. A., Sabine, A., Castellazzi, M., Morand, P., Sergeant, A., Manet, E., Boyer, V., and Gruffat, H. (2009). Characterization of the ubinuclein protein as a new member of the nuclear and adhesion complex components (NACos). *Biol Cell* **101**(6), 319-34.
- Aldinucci, D., Lorenzon, D., Cattaruzza, L., Pinto, A., Gloghini, A., Carbone, A., and Colombatti, A. (2008). Expression of CCR5 receptors on Reed-Sternberg cells and Hodgkin lymphoma cell lines: involvement of CCL5/Rantes in tumor cell growth and microenvironmental interactions. Int J Cancer 122(4), 769-76.
- Alvaro, T., Lejeune, M., Salvado, M. T., Bosch, R., Garcia, J. F., Jaen, J., Banham, A. H., Roncador, G., Montalban, C., and Piris, M. A. (2005). Outcome in Hodgkin's lymphoma can be predicted from the presence of accompanying cytotoxic and regulatory T cells. *Clin Cancer Res* **11**(4), 1467-73.
- Ambrosetti, A., Nadali, G., Vinante, F., Carlini, S., Veneri, D., Todeschini, G., Morosato, L., de Sabata, D., Chilosi, M., Maggi, E., and et al. (1993). Serum levels of soluble interleukin-2 receptor in Hodgkin disease. Relationship with clinical stage, tumor burden, and treatment outcome. *Cancer* 72(1), 201-6.
- Amiel, C., Legoff, J., Lescure, F. X., Coste-Burel, M., Deback, C., Fafi-Kremer, S., Gueudin, M., Lafon, M.
 E., Leruez-Ville, M., Mengelle, C., Payan, C., and Pillet, S. (2009). Epstein-Barr virus load in whole blood correlates with HIV surrogate markers and lymphoma: a French national cross-sectional study. J Acquir Immune Defic Syndr 50(4), 427-9.
- Amornthatree, K., Sriplung, H., Mitarnun, W., and Nittayananta, W. (2012). Effects of long-term use of antiretroviral therapy on the prevalence of oral Epstein-Barr virus. *J Oral Pathol Med* **41**(3), 249-54.
- Arbach H., I. J. (2005). "EBV and breast cancer: questions and implications. ." Epstein Barr Virus (E. S. Robertson, Ed.) Caister Academic Press, Philadelphia.
- Astrin, S. M., and Laurence, J. (1992). Human immunodeficiency virus activates c-myc and Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci* **651**, 422-32.
- Aviel, S., Winberg, G., Massucci, M., and Ciechanover, A. (2000). Degradation of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) by the ubiquitin-proteasome pathway. Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. J Biol Chem 275(31), 23491-9.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G.
 S., Satchwell, S. C., Seguin, C., and et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8
 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**(5974), 207-11.
- Banko, A., Lazarevic, I., Cupic, M., Stevanovic, G., Boricic, I., and Jovanovic, T. (2012). Carboxyterminal sequence variation of LMP1 gene in Epstein-Barr-virus-associated mononucleosis and tumors from Serbian patients. *J Med Virol* **84**(4), 632-42.
- Barozzi, P., Luppi, M., Cagossi, K., Maiorana, A., Marasca, R., Artusi, T., Poggi, S., Pileri, S. A., and Torelli, G. (1999). The oncogenic 30 and 69 bp deletion variants of the EBV LMP-1 gene are

common in HIV-negative lymphoproliferations, both malignant and benign. *Ann Oncol* **10**(4), 467-9.

- Barth, T. F., Martin-Subero, J. I., Joos, S., Menz, C. K., Hasel, C., Mechtersheimer, G., Parwaresch, R.
 M., Lichter, P., Siebert, R., and Mooller, P. (2003). Gains of 2p involving the REL locus correlate with nuclear c-Rel protein accumulation in neoplastic cells of classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 101(9), 3681-6.
- Baud, V., and Karin, M. (2009). Is NF-kappaB a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. *Nat Rev Drug Discov* **8**(1), 33-40.
- Baumforth, K. R., Birgersdotter, A., Reynolds, G. M., Wei, W., Kapatai, G., Flavell, J. R., Kalk, E., Piper, K., Lee, S., Machado, L., Hadley, K., Sundblad, A., Sjoberg, J., Bjorkholm, M., Porwit, A. A., Yap, L. F., Teo, S., Grundy, R. G., Young, L. S., Ernberg, I., Woodman, C. B., and Murray, P. G. (2008). Expression of the Epstein-Barr virus-encoded Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 in Hodgkin's lymphoma cells mediates Up-regulation of CCL20 and the migration of regulatory T cells. *Am J Pathol* 173(1), 195-204.
- Baumforth, K. R., Flavell, J. R., Reynolds, G. M., Davies, G., Pettit, T. R., Wei, W., Morgan, S., Stankovic, T., Kishi, Y., Arai, H., Nowakova, M., Pratt, G., Aoki, J., Wakelam, M. J., Young, L. S., and Murray, P. G. (2005). Induction of autotaxin by the Epstein-Barr virus promotes the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* **106**(6), 2138-46.
- Bentz, G. L., Whitehurst, C. B., and Pagano, J. S. (2011). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) C-terminal-activating region 3 contributes to LMP1-mediated cellular migration via its interaction with Ubc9. J Virol 85(19), 10144-53.
- Berger, C., McQuain, C., Sullivan, J. L., Nadal, D., Quesenberry, P. J., and Knecht, H. (1997). The 30-bp deletion variant of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein-1 prevails in acute infectious mononucleosis. *J Infect Dis* **176**(5), 1370-3.
- Berger, C., van Baarle, D., Kersten, M. J., Klein, M. R., Al-Homsi, A. S., Dunn, B., McQuain, C., van Oers, R., and Knecht, H. (1999). Carboxy terminal variants of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 during long-term human immunodeficiency virus infection: reliable markers for individual strain identification. J Infect Dis 179(1), 240-4.
- Besson, C., Amiel, C., Le-Pendeven, C., Brice, P., Ferme, C., Carde, P., Hermine, O., Raphael, M., Abel, L., and Nicolas, J. C. (2006). Positive correlation between Epstein-Barr virus viral load and anti-viral capsid immunoglobulin G titers determined for Hodgkin's lymphoma patients and their relatives. *J Clin Microbiol* **44**(1), 47-50.
- Besson, C., Goubar, A., Gabarre, J., Rozenbaum, W., Pialoux, G., Chatelet, F. P., Katlama, C., Charlotte, F., Dupont, B., Brousse, N., Huerre, M., Mikol, J., Camparo, P., Mokhtari, K., Tulliez, M., Salmon-Ceron, D., Boue, F., Costagliola, D., and Raphael, M. (2001). Changes in AIDS-related lymphoma since the era of highly active antiretroviral therapy. *Blood* **98**(8), 2339-44.
- Bhende, P. M., Seaman, W. T., Delecluse, H. J., and Kenney, S. C. (2004). The EBV lytic switch protein,
 Z, preferentially binds to and activates the methylated viral genome. *Nat Genet* 36(10), 1099-104.
- Biggar, R. J., Jaffe, E. S., Goedert, J. J., Chaturvedi, A., Pfeiffer, R., and Engels, E. A. (2006). Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood* **108**(12), 3786-91.
- Blake, S. M., Eliopoulos, A. G., Dawson, C. W., and Young, L. S. (2001). The transmembrane domains of the EBV-encoded latent membrane protein 1 (LMP1) variant CAO regulate enhanced signalling activity. *Virology* **282**(2), 278-87.
- Boiocchi, M., De Re, V., Gloghini, A., Vaccher, E., Dolcetti, R., Marzotto, A., Bertola, G., and Carbone, A. (1993a). High incidence of monoclonal EBV episomes in Hodgkin's disease and anaplastic large-cell KI-1-positive lymphomas in HIV-1-positive patients. *Int J Cancer* 54(1), 53-9.
- Boiocchi, M., Dolcetti, R., De Re, V., Gloghini, A., and Carbone, A. (1993b). Demonstration of a unique Epstein-Barr virus-positive cellular clone in metachronous multiple localizations of Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **142**(1), 33-8.
- Borza, C. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2002). Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat Med* **8**(6), 594-9.

- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., and Jove, R. (2000). STATs in oncogenesis. Oncogene 19(21), 2474-88.
- Brauninger, A., Hansmann, M. L., Strickler, J. G., Dummer, R., Burg, G., Rajewsky, K., and Kuppers, R. (1999). Identification of common germinal-center B-cell precursors in two patients with both Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* **340**(16), 1239-47.
- Brocqueville, G., Ndour, P. A., Ouk, T. S., Le Goff, A., De Witte, C., Mougel, A., Coll, J., Fafeur, V., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. (2013). LMP1-Induced Cell Death May Contribute to the Emergency of Its Oncogenic Property. *PLoS One* **8**(4), e60743.
- Brousset, P., Knecht, H., Rubin, B., Drouet, E., Chittal, S., Meggetto, F., Saati, T. A., Bachmann, E., Denoyel, G., Sergeant, A., and et al. (1993). Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* **82**(3), 872-6.
- Brousset, P., Schlaifer, D., Meggetto, F., Bachmann, E., Rothenberger, S., Pris, J., Delsol, G., and Knecht, H. (1994). Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood* **84**(8), 2447-51.
- Brune, V., Tiacci, E., Pfeil, I., Doring, C., Eckerle, S., van Noesel, C. J., Klapper, W., Falini, B., von Heydebreck, A., Metzler, D., Brauninger, A., Hansmann, M. L., and Kuppers, R. (2008). Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. J Exp Med 205(10), 2251-68.
- Cahir-McFarland, E. D., Carter, K., Rosenwald, A., Giltnane, J. M., Henrickson, S. E., Staudt, L. M., and Kieff, E. (2004). Role of NF-kappa B in cell survival and transcription of latent membrane protein 1-expressing or Epstein-Barr virus latency III-infected cells. *J Virol* **78**(8), 4108-19.
- Caldwell, R. G., Wilson, J. B., Anderson, S. J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**(3), 405-11.
- Calender, A., Cordier, M., Billaud, M., and Lenoir, G. M. (1990). Modulation of cellular gene expression in B lymphoma cells following in vitro infection by Epstein-Barr virus (EBV). *Int J Cancer* **46**(4), 658-63.
- Caraballo Cortes, K., Zagordi, O., Laskus, T., Ploski, R., Bukowska-Osko, I., Pawelczyk, A., Berak, H., and Radkowski, M. (2013). Ultradeep pyrosequencing of hepatitis C virus hypervariable region 1 in quasispecies analysis. *Biomed Res Int* **2013**, 626083.
- Chan, A. T., Lo, Y. M., Zee, B., Chan, L. Y., Ma, B. B., Leung, S. F., Mo, F., Lai, M., Ho, S., Huang, D. P., and Johnson, P. J. (2002). Plasma Epstein-Barr virus DNA and residual disease after radiotherapy for undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **94**(21), 1614-9.
- Chang, C. M., Yu, K. J., Mbulaiteye, S. M., Hildesheim, A., and Bhatia, K. (2009). The extent of genetic diversity of Epstein-Barr virus and its geographic and disease patterns: a need for reappraisal. *Virus Res* **143**(2), 209-21.
- Chang, Y., Lee, H. H., Chang, S. S., Hsu, T. Y., Wang, P. W., Chang, Y. S., Takada, K., and Tsai, C. H. (2004). Induction of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 by a lytic transactivator Rta. *J Virol* **78**(23), 13028-36.
- Chen, C., Li, D., and Guo, N. (2009). Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther* **8**(11), 987-95.
- Chen, H., Lee, J. M., Zong, Y., Borowitz, M., Ng, M. H., Ambinder, R. F., and Hayward, S. D. (2001). Linkage between STAT regulation and Epstein-Barr virus gene expression in tumors. *J Virol* **75**(6), 2929-37.
- Chen, H. C., Chen, G. H., Chen, Y. H., Liao, W. L., Liu, C. Y., Chang, K. P., Chang, Y. S., and Chen, S. J. (2009). MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* **100**(6), 1002-11.
- Chen, R. H., Chang, M. C., Su, Y. H., Tsai, Y. T., and Kuo, M. L. (1999). Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-

kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* **274**(33), 23013-9.

- Chene, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A. O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K. I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M. T. (2007). A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog* 3(6), e80.
- Chijioke, O., Azzi, T., Nadal, D., and Munz, C. (2013). Innate immune responses against Epstein Barr virus infection. *J Leukoc Biol*.
- Cohen, J. I., and Kieff, E. (1991). An Epstein-Barr virus nuclear protein 2 domain essential for transformation is a direct transcriptional activator. *J Virol* **65**(11), 5880-5.
- Conti, A., Sueur, C., Lupo, J., Brazzolotto, X., Burmeister, W. P., Manet, E., Gruffat, H., Morand, P., and Boyer, V. (2013). Interaction of Ubinuclein-1, a nuclear and adhesion junction protein, with the 14-3-3 epsilon protein in epithelial cells: implication of the PKA pathway. *Eur J Cell Biol* 92(3), 105-11.
- Damle, R. N., Advani, S. H., and Gangal, S. G. (1992). Analysis of regulation of T-cell responses by soluble inhibitory factors from the sera of patients with Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **50**(2), 192-6.
- Dawson, C. W., Eliopoulos, A. G., Blake, S. M., Barker, R., and Young, L. S. (2000). Identification of functional differences between prototype Epstein-Barr virus-encoded LMP1 and a nasopharyngeal carcinoma-derived LMP1 in human epithelial cells. *Virology* 272(1), 204-17.
- Dawson, C. W., Laverick, L., Morris, M. A., Tramoutanis, G., and Young, L. S. (2008). Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* **82**(7), 3654-64.
- Dawson, C. W., Port, R. J., and Young, L. S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin Cancer Biol* **22**(2), 144-53.
- Dawson, C. W., Rickinson, A. B., and Young, L. S. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* **344**(6268), 777-80.
- De Falco, G., Antonicelli, G., Onnis, A., Lazzi, S., Bellan, C., and Leoncini, L. (2009). Role of EBV in microRNA dysregulation in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* **19**(6), 401-6.
- de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., and de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* **174**(4), 915-24.
- Delecluse, H. J., Feederle, R., O'Sullivan, B., and Taniere, P. (2007). Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol* **60**(12), 1358-64.
- Deng, W., Pang, P. S., Tsang, C. M., Hau, P. M., Yip, Y. L., Cheung, A. L., and Tsao, S. W. (2012). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 impairs G2 checkpoint in human nasopharyngeal epithelial cells through defective Chk1 activation. *PLoS One* 7(6), e39095.
- Devergne, O., Hatzivassiliou, E., Izumi, K. M., Kaye, K. M., Kleijnen, M. F., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* **16**(12), 7098-108.
- Diehl, V., Kirchner, H. H., Burrichter, H., Stein, H., Fonatsch, C., Gerdes, J., Schaadt, M., Heit, W., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A., Heintz, F., and Sueno, K. (1982). Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. *Cancer Treat Rep* **66**(4), 615-32.
- Diez-Martin, J. L., Balsalobre, P., Re, A., Michieli, M., Ribera, J. M., Canals, C., Conde, E., Rosselet, A., Gabriel, I., Varela, R., Allione, B., Cwynarski, K., Genet, P., Espigado, I., Biron, P., Schmitz, N., Hunter, A. E., Ferrant, A., Guillerm, G., Hentrich, M., Jurado, M., Fernandez, P., Serrano, D., Rossi, G., and Sureda, A. (2009). Comparable survival between HIV+ and HIV- non-Hodgkin

and Hodgkin lymphoma patients undergoing autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Blood* **113**(23), 6011-4.

- Dirmeier, U., Neuhierl, B., Kilger, E., Reisbach, G., Sandberg, M. L., and Hammerschmidt, W. (2003). Latent membrane protein 1 is critical for efficient growth transformation of human B cells by epstein-barr virus. *Cancer Res* **63**(11), 2982-9.
- Dolcetti, R., and Boiocchi, M. (1998). Epstein-Barr virus in the pathogenesis of Hodgkin's disease. Biomed Pharmacother **52**(1), 13-25.
- Dolcetti, R., Boiocchi, M., Gloghini, A., and Carbone, A. (2001). Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur J Cancer* **37**(10), 1276-87.
- Dolcetti, R., Quaia, M., Gloghini, A., De Re, V., Zancai, P., Cariati, R., Babuin, L., Cilia, A. M., Rizzo, S., Carbone, A., and Boiocchi, M. (1999). Biologically relevant phenotypic changes and enhanced growth properties induced in B lymphocytes by an EBV strain derived from a histologically aggressive Hodgkin's disease. *Int J Cancer* **80**(2), 240-9.
- Dolcetti, R., Zancai, P., De Re, V., Gloghini, A., Bigoni, B., Pivetta, B., De Vita, S., Carbone, A., and Boiocchi, M. (1997). Epstein-Barr virus strains with latent membrane protein-1 deletions: prevalence in the Italian population and high association with human immunodeficiency virus-related Hodgkin's disease. *Blood* **89**(5), 1723-31.
- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G., and Bornkamm, G. W. (2003). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *J Virol* **77**(15), 8290-8.
- Edwards, R. H., Seillier-Moiseiwitsch, F., and Raab-Traub, N. (1999). Signature amino acid changes in latent membrane protein 1 distinguish Epstein-Barr virus strains. *Virology* **261**(1), 79-95.
- Edwards, R. H., Sitki-Green, D., Moore, D. T., and Raab-Traub, N. (2004). Potential selection of LMP1 variants in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* **78**(2), 868-81.
- Eliopoulos, A. G., Davies, C., Blake, S. S., Murray, P., Najafipour, S., Tsichlis, P. N., and Young, L. S. (2002). The oncogenic protein kinase Tpl-2/Cot contributes to Epstein-Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1-induced NF-kappaB signaling downstream of TRAF2. *J Virol* **76**(9), 4567-79.
- Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W., and Young, L. S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J Biol Chem* **274**(23), 16085-96.
- Eliopoulos, A. G., and Young, L. S. (1998). Activation of the cJun N-terminal kinase (JNK) pathway by the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 (LMP1). *Oncogene* **16**(13), 1731-42.
- Epstein, M. A., Henle, G., Achong, B. G., and Barr, Y. M. (1965). Morphological and Biological Studies on a Virus in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *J Exp Med* **121**, 761-70.
- Ersing, I., Bernhardt, K., and Gewurz, B. E. (2013). NF-kappaB and IRF7 Pathway Activation by Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses* **5**(6), 1587-606.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Brion, J. P., Pavese, P., Baccard, M., Germi, R., Genoulaz, O., Nicod, S., Jolivet, M., Ruigrok, R. W., Stahl, J. P., and Seigneurin, J. M. (2005a). Long-term shedding of infectious epstein-barr virus after infectious mononucleosis. J Infect Dis 191(6), 985-9.
- Fafi-Kremer, S., Morand, P., Germi, R., Ballout, M., Brion, J. P., Genoulaz, O., Nicod, S., Stahl, J. P., Ruigrok, R. W., and Seigneurin, J. M. (2005b). A prospective follow-up of Epstein-Barr virus LMP1 genotypes in saliva and blood during infectious mononucleosis. J Infect Dis 192(12), 2108-11.
- Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. (2000). Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol* **74**(13), 5810-8.
- Fahraeus, R., Chen, W., Trivedi, P., Klein, G., and Obrink, B. (1992). Decreased expression of Ecadherin and increased invasive capacity in EBV-LMP-transfected human epithelial and murine adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* **52**(5), 834-8.

- Faumont, N., Chanut, A., Benard, A., Cogne, N., Delsol, G., Feuillard, J., and Meggetto, F. (2009). Comparative analysis of oncogenic properties and nuclear factor-kappaB activity of latent membrane protein 1 natural variants from Hodgkin's lymphoma's Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes. *Haematologica* 94(3), 355-63.
- Faumont, N., Trempat, P., Brousset, P., Delsol, G., and Meggetto, F. (2004). In Hodgkin's disease Reed-Sternberg cells and normal B-lymphocytes are infected by related Epstein-Barr virus strains. *Virus Res* **101**(2), 163-73.
- Feederle, R., Linnstaedt, S. D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B. R., and Delecluse, H. J. (2011). A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog* 7(2), e1001294.
- Flanagan, J., Middeldorp, J., and Sculley, T. (2003). Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol* **84**(Pt 7), 1871-9.
- Flavell, J. R., Baumforth, K. R., Wood, V. H., Davies, G. L., Wei, W., Reynolds, G. M., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, G. L., Young, L. S., and Murray, P. G. (2008). Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* **111**(1), 292-301.
- Flavell, K. J., Linford, J. A., Flavell, J. R., Murray, P. G., Young, L. S., and Scott, K. (2000). Detection of Epstein-Barr virus in archival Hodgkin's disease specimens. *Mol Pathol* **53**(3), 162.
- Flavell, K. J., and Murray, P. G. (2000). Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol Pathol* **53**(5), 262-9.
- Floettmann, J. E., Ward, K., Rickinson, A. B., and Rowe, M. (1996). Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology* **223**(1), 29-40.
- Forte, E., and Luftig, M. A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect* **13**(14-15), 1156-67.
- Fries, K. L., Miller, W. E., and Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* **70**(12), 8653-9.
- Fukuda, M., Kurosaki, W., Yanagihara, K., Kuratsune, H., and Sairenji, T. (2002). A mechanism in Epstein-Barr virus oncogenesis: inhibition of transforming growth factor-beta 1-mediated induction of MAPK/p21 by LMP1. *Virology* **302**(2), 310-20.
- Garcia-Cosio, M., Santon, A., Martin, P., Reguero, M. E., Cristobal, E., and Bellas, C. (2008). Analysis of Epstein-Barr virus strains and variants in classical Hodgkin's lymphoma by laser microdissection. *Histol Histopathol* **23**(2), 209-17.
- Germi, R., Effantin, G., Grossi, L., Ruigrok, R. W., Morand, P., and Schoehn, G. (2012). Threedimensional structure of the Epstein-Barr virus capsid. *J Gen Virol* **93**(Pt 8), 1769-73.
- Gerper, P., Whang-Peng, J., and Monroe, J. H. (1969). Transformation and chromosome changes induced by Epstein-Barr virus in normal human leukocyte cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63**(3), 740-7.
- Gewurz, B. E., Towfic, F., Mar, J. C., Shinners, N. P., Takasaki, K., Zhao, B., Cahir-McFarland, E. D., Quackenbush, J., Xavier, R. J., and Kieff, E. (2012). Genome-wide siRNA screen for mediators of NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(7), 2467-72.
- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18(11), 3064-73.
- Gires, O., Zimber-Strobl, U., Gonnella, R., Ueffing, M., Marschall, G., Zeidler, R., Pich, D., and Hammerschmidt, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* **16**(20), 6131-40.
- Gotti, D., Danesi, M., Calabresi, A., Ferraresi, A., Albini, L., Donato, F., Castelli, F., Scalzini, A., Quiros, R., and Brescia Hiv Cancer Study Group, E. (2013). Clinical Characteristics, Incidence, and Risk Factors of HIV-Related Hodgkin Lymphoma in the Era of Combination Antiretroviral Therapy. *AIDS Patient Care STDS* **27**(5), 259-65.

- Gou, X. M., Chen, Y., Chen, X. Y., and Arrand, J. R. (2003). [Effects of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1(EBV-LMP1) on related factors of metastasis of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE1]. *Ai Zheng* **22**(5), 481-5.
- Gourzones, C., Ferrand, F. R., Amiel, C., Verillaud, B., Barat, A., Guerin, M., Gattolliat, C. H., Gelin, A., Klibi, J., Chaaben, A. B., Schneider, V., Guemira, F., Guigay, J., Lang, P., Jimenez-Pailhes, A. S., and Busson, P. (2013). Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients - evidence of non-exosomal transport. *Virol J* **10**, 119.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, T. F., Morris, C. A., and Sturzl, M. (2005). EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* **105**(8), 3263-9.
- Gruffat, H., Kadjouf, F., Mariame, B., and Manet, E. (2012). The Epstein-Barr virus BcRF1 gene product is a TBP-like protein with an essential role in late gene expression. *J Virol* **86**(11), 6023-32.
- Gruffat, H., Lupo, J., Morand, P., Boyer, V., and Manet, E. (2011). The nuclear and adherent junction complex component protein ubinuclein negatively regulates the productive cycle of Epstein-Barr virus in epithelial cells. *J Virol* **85**(2), 784-94.
- Gruss, H. J., Pinto, A., Duyster, J., Poppema, S., and Herrmann, F. (1997). Hodgkin's disease: a tumor with disturbed immunological pathways. *Immunol Today* **18**(4), 156-63.
- Guidoboni, M., Ponzoni, M., Caggiari, L., Lettini, A. A., Vago, L., De Re, V., Gloghini, A., Zancai, P., Carbone, A., Boiocchi, M., and Dolcetti, R. (2005). Latent membrane protein 1 deletion mutants accumulate in reed-sternberg cells of human immunodeficiency virus-related Hodgkin's lymphoma. *J Virol* **79**(4), 2643-9.
- Guiguet, M., Boue, F., Cadranel, J., Lang, J. M., Rosenthal, E., and Costagliola, D. (2009). Effect of immunodeficiency, HIV viral load, and antiretroviral therapy on the risk of individual malignancies (FHDH-ANRS CO4): a prospective cohort study. *Lancet Oncol* **10**(12), 1152-9.
- Guo, L., Tang, M., Yang, L., Xiao, L., Bode, A. M., Li, L., Dong, Z., and Cao, Y. (2012). Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 mediates survivin upregulation by p53 contributing to G1/S cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Mol Med* **29**(4), 574-80.
- Hadhri-Guiga, B., Khabir, A. M., Mokdad-Gargouri, R., Ghorbel, A. M., Drira, M., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., and Gargouri, A. (2006). Various 30 and 69 bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients. *Virus Res* 115(1), 24-30.
- Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C. C., and Thorley-Lawson, D. A. (2009). The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* **5**(7), e1000496.
- Hamilton-Dutoit, S. J., Raphael, M., Audouin, J., Diebold, J., Lisse, I., Pedersen, C., Oksenhendler, E., Marelle, L., and Pallesen, G. (1993). In situ demonstration of Epstein-Barr virus small RNAs (EBER 1) in acquired immunodeficiency syndrome-related lymphomas: correlation with tumor morphology and primary site. *Blood* 82(2), 619-24.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (2013). Replication of Epstein-Barr viral DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**(1), a013029.
- Hammerschmidt, W., Sugden, B., and Baichwal, V. R. (1989). The transforming domain alone of the latent membrane protein of Epstein-Barr virus is toxic to cells when expressed at high levels. *J Virol* **63**(6), 2469-75.
- Handel, A. E., Williamson, A. J., Disanto, G., Handunnetthi, L., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S. V. (2010). An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PLoS One* 5(9).
- Harada, S., and Kieff, E. (1997). Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* **71**(9), 6611-8.

- Henle, G., Henle, W., Clifford, P., Diehl, V., Kafuko, G. W., Kirya, B. G., Klein, G., Morrow, R. H., Munube, G. M., Pike, P., Tukei, P. M., and Ziegler, J. L. (1969). Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. *J Natl Cancer Inst* **43**(5), 1147-57.
- Herbst, H., Foss, H. D., Samol, J., Araujo, I., Klotzbach, H., Krause, H., Agathanggelou, A., Niedobitek, G., and Stein, H. (1996). Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood* 87(7), 2918-29.
- Herida, M., Mary-Krause, M., Kaphan, R., Cadranel, J., Poizot-Martin, I., Rabaud, C., Plaisance, N., Tissot-Dupont, H., Boue, F., Lang, J. M., and Costagliola, D. (2003). Incidence of non-AIDSdefining cancers before and during the highly active antiretroviral therapy era in a cohort of human immunodeficiency virus-infected patients. J Clin Oncol **21**(18), 3447-53.
- Herndier, B. G., Sanchez, H. C., Chang, K. L., Chen, Y. Y., and Weiss, L. M. (1993). High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am J Pathol* **142**(4), 1073-9.
- Hertel, C. B., Zhou, X. G., Hamilton-Dutoit, S. J., and Junker, S. (2002). Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene* **21**(32), 4908-20.
- Higuchi, M., Kieff, E., and Izumi, K. M. (2002). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J Virol* **76**(1), 455-9.
- Higuchi, R., Krummel, B., and Saiki, R. K. (1988). A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**(15), 7351-67.
- Hinz, M., Loser, P., Mathas, S., Krappmann, D., Dorken, B., and Scheidereit, C. (2001). Constitutive NFkappaB maintains high expression of a characteristic gene network, including CD40, CD86, and a set of antiapoptotic genes in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood* **97**(9), 2798-807.
- Hislop, A. D., Taylor, G. S., Sauce, D., and Rickinson, A. B. (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* **25**, 587-617.
- Hohaus, S., Santangelo, R., Giachelia, M., Vannata, B., Massini, G., Cuccaro, A., Martini, M., Cesarini, V., Cenci, T., D'Alo, F., Voso, M. T., Fadda, G., Leone, G., and Larocca, L. M. (2011). The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 17(9), 2885-92.
- Hoppe, R. T., Advani, R. H., Ai, W. Z., Ambinder, R. F., Bello, C. M., Bierman, P. J., Blum, K. A., Dabaja, B., Duron, Y., Forero, A., Gordon, L. I., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Hochberg, E. P., Maloney, D. G., Mansur, D., Mauch, P. M., Metzger, M., Moore, J. O., Morgan, D., Moskowitz, C. H., Poppe, M., Pro, B., Weiss, L., Winter, J. N., and Yahalom, J. (2011). Hodgkin lymphoma. J Natl Compr Canc Netw 9(9), 1020-58.
- Horikawa, T., Yang, J., Kondo, S., Yoshizaki, T., Joab, I., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (2007). Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* **67**(5), 1970-8.
- Horikawa, T., Yoshizaki, T., Sheen, T. S., Lee, S. Y., and Furukawa, M. (2000). Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* **89**(4), 715-23.
- Hsu, D. H., de Waal Malefyt, R., Fiorentino, D. F., Dang, M. N., Vieira, P., de Vries, J., Spits, H., Mosmann, T. R., and Moore, K. W. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science* **250**(4982), 830-2.
- Hu, L. F., Chen, F., Zheng, X., Ernberg, I., Cao, S. L., Christensson, B., Klein, G., and Winberg, G. (1993).
 Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene* 8(6), 1575-83.
- Huang, S., Mills, L., Mian, B., Tellez, C., McCarty, M., Yang, X. D., Gudas, J. M., and Bar-Eli, M. (2002).
 Fully humanized neutralizing antibodies to interleukin-8 (ABX-IL8) inhibit angiogenesis, tumor growth, and metastasis of human melanoma. *Am J Pathol* 161(1), 125-34.

- Huang, X., Kushekhar, K., Nolte, I., Kooistra, W., Visser, L., Bouwman, I., Kouprie, N., Veenstra, R., van Imhoff, G., Olver, B., Houlston, R. S., Poppema, S., Diepstra, A., Hepkema, B., and van den Berg, A. (2012). HLA associations in classical Hodgkin lymphoma: EBV status matters. *PLoS One* 7(7), e39986.
- Huo, Q., Zhang, N., and Yang, Q. (2012). Epstein-Barr virus infection and sporadic breast cancer risk: a meta-analysis. *PLoS One* **7**(2), e31656.
- Irsch, J., Wolf, J., Tesch, H., Diehl, V., Radbruch, A., and Staratschek-Jox, A. (2001). Class switch recombination was specifically targeted to immunoglobulin (Ig)G4 or IgA in Hodgkin's disease-derived cell lines. *Br J Haematol* **113**(3), 785-93.
- Isaacson, P. G., Schmid, C., Pan, L., Wotherspoon, A. C., and Wright, D. H. (1992). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression by Hodgkin and Reed-Sternberg-like cells in acute infectious mononucleosis. *J Pathol* **167**(3), 267-71.
- Israel, B. F., Shannon, C.K. (2005). "EBV lytic infection." Epstein Barr Virus (E. S. Robertson, Ed.) Caister Academic Press, Philadelphia.
- Izumi, K. M., Cahir McFarland, E. D., Riley, E. A., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. (1999). The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **73**(12), 9908-16.
- Jarrett, R. F. (2002). Viruses and Hodgkin's lymphoma. Ann Oncol **13 Suppl 1**, 23-9.
- Johannsen, E., Koh, E., Mosialos, G., Tong, X., Kieff, E., and Grossman, S. R. (1995). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 transactivation of the latent membrane protein 1 promoter is mediated by J kappa and PU.1. J Virol 69(1), 253-62.
- Johnson, R. J., Stack, M., Hazlewood, S. A., Jones, M., Blackmore, C. G., Hu, L. F., and Rowe, M. (1998). The 30-base-pair deletion in Chinese variants of the Epstein-Barr virus LMP1 gene is not the major effector of functional differences between variant LMP1 genes in human lymphocytes. *J Virol* **72**(5), 4038-48.
- Joos, S., Kupper, M., Ohl, S., von Bonin, F., Mechtersheimer, G., Bentz, M., Marynen, P., Moller, P., Pfreundschuh, M., Trumper, L., and Lichter, P. (2000). Genomic imbalances including amplification of the tyrosine kinase gene JAK2 in CD30+ Hodgkin cells. *Cancer Res* **60**(3), 549-52.
- Juillard, F., Bazot, Q., Mure, F., Tafforeau, L., Macri, C., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Manet, E., and Gruffat, H. (2012). Epstein-Barr virus protein EB2 stimulates cytoplasmic mRNA accumulation by counteracting the deleterious effects of SRp20 on viral mRNAs. *Nucleic Acids Res* **40**(14), 6834-49.
- Juillard, F., Hiriart, E., Sergeant, N., Vingtdeux-Didier, V., Drobecq, H., Sergeant, A., Manet, E., and Gruffat, H. (2009). Epstein-Barr virus protein EB2 contains an N-terminal transferable nuclear export signal that promotes nucleocytoplasmic export by directly binding TAP/NXF1. J Virol 83(24), 12759-68.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G. W., and Kempkes, B. (1999). The protooncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. J Virol 73(5), 4481-4.
- Kanakry, J. A., Li, H., Gellert, L. L., Lemas, M. V., Hsieh, W. S., Hong, F., Tan, K. L., Gascoyne, R. D., Gordon, L. I., Fisher, R. I., Bartlett, N. L., Stiff, P., Cheson, B. D., Advani, R., Miller, T. P., Kahl, B. S., Horning, S. J., and Ambinder, R. F. (2013). Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American cooperative group trial. *Blood* 121(18), 3547-53.
- Kang, Y., and Massague, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell* **118**(3), 277-9.
- Kaplan, L. D. (2012). Management of HIV-Associated Hodgkin Lymphoma: How Far We Have Come. *J Clin Oncol* **30**(33), 4056-8.
- Kapp, U., Yeh, W. C., Patterson, B., Elia, A. J., Kagi, D., Ho, A., Hessel, A., Tipsword, M., Williams, A., Mirtsos, C., Itie, A., Moyle, M., and Mak, T. W. (1999). Interleukin 13 is secreted by and stimulates the growth of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. J Exp Med 189(12), 1939-46.

- Kawano, Y., Iwata, S., Kawada, J. I., Gotoh, K., Suzuki, M., Torii, Y., Kojima, S., Kimura, H., and Ito, Y. (2013). Plasma Viral MicroRNA Profiles Reveal Potential Biomarkers for Chronic Active Epstein-Barr Virus Infection. J Infect Dis.
- Kaye, K. M., Devergne, O., Harada, J. N., Izumi, K. M., Yalamanchili, R., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(20), 11085-90.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(19), 9150-4.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R., and Kieff, E. (1999). An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. J Virol 73(12), 10525-30.
- Kaye, K. M., Izumi, K. M., Mosialos, G., and Kieff, E. (1995). The Epstein-Barr virus LMP1 cytoplasmic carboxy terminus is essential for B-lymphocyte transformation; fibroblast cocultivation complements a critical function within the terminal 155 residues. *J Virol* **69**(2), 675-83.
- Kaykas, A., and Sugden, B. (2000). The amino-terminus and membrane-spanning domains of LMP-1 inhibit cell proliferation. *Oncogene* **19**(11), 1400-10.
- Kenney, S. C., Holley-Guthrie, E., Quinlivan, E. B., Gutsch, D., Zhang, Q., Bender, T., Giot, J. F., and Sergeant, A. (1992). The cellular oncogene c-myb can interact synergistically with the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator in lymphoid cells. *Mol Cell Biol* **12**(1), 136-46.
- Keryer-Bibens, C., Pioche-Durieu, C., Villemant, C., Souquere, S., Nishi, N., Hirashima, M., Middeldorp, J., and Busson, P. (2006). Exosomes released by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells convey the viral latent membrane protein 1 and the immunomodulatory protein galectin 9. *BMC Cancer* 6, 283.
- Khan, G. (2006). Epstein-Barr virus, cytokines, and inflammation: a cocktail for the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma? *Exp Hematol* **34**(4), 399-406.
- Kieser, A., Kilger, E., Gires, O., Ueffing, M., Kolch, W., and Hammerschmidt, W. (1997). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* 16(21), 6478-85.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated Bcell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 17(6), 1700-9.
- Kim, K. R., Yoshizaki, T., Miyamori, H., Hasegawa, K., Horikawa, T., Furukawa, M., Harada, S., Seiki, M., and Sato, H. (2000). Transformation of Madin-Darby canine kidney (MDCK) epithelial cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) induces expression of Ets1 and invasive growth. Oncogene 19(14), 1764-71.
- Kis, L. L., Nishikawa, J., Takahara, M., Nagy, N., Matskova, L., Takada, K., Elmberger, P. G., Ohlsson, A., Klein, G., and Klein, E. (2005). In vitro EBV-infected subline of KMH2, derived from Hodgkin lymphoma, expresses only EBNA-1, while CD40 ligand and IL-4 induce LMP-1 but not EBNA-2. *Int J Cancer* **113**(6), 937-45.
- Kis, L. L., Takahara, M., Nagy, N., Klein, G., and Klein, E. (2006). Cytokine mediated induction of the major Epstein-Barr virus (EBV)-encoded transforming protein, LMP-1. *Immunol Lett* **104**(1-2), 83-8.
- Klein, C., Rothenberger, S., Niemeyer, C., Bachmann, E., Odermatt, B., Bohm, N., Brandis, M., and Knecht, H. (1995). EBV-associated lymphoproliferative syndrome with a distinct 69 base-pair deletion in the LMP-1 oncogene. *Br J Haematol* **91**(4), 938-40.
- Knecht, H., Bachmann, E., Brousset, P., Sandvej, K., Nadal, D., Bachmann, F., Odermatt, B. F., Delsol, G., and Pallesen, G. (1993). Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 82(10), 2937-42.
- Knecht, H., McQuain, C., Martin, J., Rothenberger, S., Drexler, H. G., Berger, C., Bachmann, E., Kittler, E. L., Odermatt, B. F., and Quesenberry, P. J. (1996). Expression of the LMP1 oncoprotein in

the EBV negative Hodgkin's disease cell line L-428 is associated with Reed-Sternberg cell morphology. *Oncogene* **13**(5), 947-53.

- Knight, J. S., Sharma, N., and Robertson, E. S. (2005). Epstein-Barr virus latent antigen 3C can mediate the degradation of the retinoblastoma protein through an SCF cellular ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18562-6.
- Kung, C. P., Meckes, D. G., Jr., and Raab-Traub, N. (2011). Epstein-Barr virus LMP1 activates EGFR, STAT3, and ERK through effects on PKCdelta. *J Virol* **85**(9), 4399-408.
- Kung, C. P., and Raab-Traub, N. (2008). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *J Virol* **82**(11), 5486-93.
- Kuppers, R. (2009). Molecular biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 491-6.
- Kuppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R., and Hansmann, M. L. (1994). Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(23), 10962-6.
- Kusano, S., and Raab-Traub, N. (2001). An Epstein-Barr virus protein interacts with Notch. *J Virol* **75**(1), 384-95.
- Lam, N., Sandberg, M. L., and Sugden, B. (2004). High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. *J Virol* **78**(4), 1657-64.
- Lanoy, E., Rosenberg, P. S., Fily, F., Lascaux, A. S., Martinez, V., Partisani, M., Poizot-Martin, I., Rouveix, E., Engels, E. A., Costagliola, D., and Goedert, J. J. (2011). HIV-associated Hodgkin lymphoma during the first months on combination antiretroviral therapy. *Blood* **118**(1), 44-9.
- Larcher, C., Bernhard, D., Schaadt, E., Adler, B., Ausserlechner, M. J., Mitterer, M., and Huemer, H. P. (2003). Functional analysis of the mutated Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1(69del): implications for a new role of naturally occurring LMP1 variants. *Haematologica* **88**(12), 1324-35.
- Lazzi, S., Bellan, C., De Falco, G., Cinti, C., Ferrari, F., Nyongo, A., Claudio, P. P., Tosi, G. M., Vatti, R., Gloghini, A., Carbone, A., Giordano, A., Leoncini, L., and Tosi, P. (2002). Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol* 33(7), 723-31.
- Le Clorennec, C., Ouk, T. S., Youlyouz-Marfak, I., Panteix, S., Martin, C. C., Rastelli, J., Adriaenssens, E., Zimber-Strobl, U., Coll, J., Feuillard, J., and Jayat-Vignoles, C. (2008). Molecular basis of cytotoxicity of Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 (LMP1) in EBV latency III B cells: LMP1 induces type II ligand-independent autoactivation of CD95/Fas with caspase 8mediated apoptosis. *J Virol* **82**(13), 6721-33.
- Le Clorennec, C., Youlyouz-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, G. W., and Feuillard, J. (2006). EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* **107**(5), 2070-8.
- Lee, D. Y., and Sugden, B. (2008a). The latent membrane protein 1 oncogene modifies B-cell physiology by regulating autophagy. *Oncogene* **27**(20), 2833-42.
- Lee, D. Y., and Sugden, B. (2008b). The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood* **111**(4), 2280-9.
- Lee, H. S., Chang, M. S., Yang, H. K., Lee, B. L., and Kim, W. H. (2004). Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with epstein-barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**(5), 1698-705.
- Leonard, W. J., and O'Shea, J. J. (1998). Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* **16**, 293-322.
- Levine, P. H., Ablashi, D. V., Berard, C. W., Carbone, P. P., Waggoner, D. E., and Malan, L. (1971). Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Cancer* **27**(2), 416-21.

- Li, J. C., Lee, D. C., Cheung, B. K., and Lau, A. S. (2005). Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett* **579**(14), 3055-62.
- Li, L., Guo, L., Tao, Y., Zhou, S., Wang, Z., Luo, W., Hu, D., Li, Z., Xiao, L., Tang, M., Yi, W., Tsao, S. W., and Cao, Y. (2007). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus regulates p53 phosphorylation through MAP kinases. *Cancer Lett* **255**(2), 219-31.
- Li, Q., Spriggs, M. K., Kovats, S., Turk, S. M., Comeau, M. R., Nepom, B., and Hutt-Fletcher, L. M. (1997). Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* **71**(6), 4657-62.
- Li, W. X. (2008). Canonical and non-canonical JAK-STAT signaling. *Trends Cell Biol* 18(11), 545-51.
- Liu, L. T., Peng, J. P., Chang, H. C., and Hung, W. C. (2003). RECK is a target of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *Oncogene* **22**(51), 8263-70.
- Lo, A. K., Huang, D. P., Lo, K. W., Chui, Y. L., Li, H. M., Pang, J. C., and Tsao, S. W. (2004). Phenotypic alterations induced by the Hong Kong-prevalent Epstein-Barr virus-encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells. *Int J Cancer* **109**(6), 919-25.
- Lossius, A., Johansen, J. N., Torkildsen, O., Vartdal, F., and Holmoy, T. (2012). Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. *Viruses* **4**(12), 3701-30.
- Lu, J., Chua, H. H., Chen, S. Y., Chen, J. Y., and Tsai, C. H. (2003). Regulation of matrix metalloproteinase-1 by Epstein-Barr virus proteins. *Cancer Res* **63**(1), 256-62.
- Lupo, J., Conti, A., Sueur, C., Coly, P. A., Coute, Y., Hunziker, W., Burmeister, W. P., Germi, R., Manet, E., Gruffat, H., Morand, P., and Boyer, V. (2012). Identification of new interacting partners of the shuttling protein ubinuclein (Ubn-1). *Exp Cell Res* **318**(5), 509-20.
- Mainou, B. A., Everly, D. N., Jr., and Raab-Traub, N. (2005). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* **24**(46), 6917-24.
- Man, C., Rosa, J., Lee, L. T., Lee, V. H., Chow, B. K., Lo, K. W., Doxsey, S., Wu, Z. G., Kwong, Y. L., Jin, D. Y., Cheung, A. L., and Tsao, S. W. (2007). Latent membrane protein 1 suppresses RASSF1A expression, disrupts microtubule structures and induces chromosomal aberrations in human epithelial cells. Oncogene 26(21), 3069-80.
- Mannick, J. B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E., and Stamler, J. S. (1994). Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* **79**(7), 1137-46.
- Mannick, J. B., Cohen, J. I., Birkenbach, M., Marchini, A., and Kieff, E. (1991). The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* **65**(12), 6826-37.
- Marafioti, T., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Foss, H. D., Huhn, D., and Stein, H. (1999). Classical Hodgkin's disease and follicular lymphoma originating from the same germinal center B cell. *J Clin Oncol* **17**(12), 3804-9.
- Mathas, S., Johrens, K., Joos, S., Lietz, A., Hummel, F., Janz, M., Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Bommert, K., Lichter, P., Stein, H., Scheidereit, C., and Dorken, B. (2005). Elevated NF-kappaB p50 complex formation and Bcl-3 expression in classical Hodgkin, anaplastic large-cell, and other peripheral T-cell lymphomas. *Blood* **106**(13), 4287-93.
- Mazouni, C., Fina, F., Romain, S., Ouafik, L., Bonnier, P., Brandone, J. M., and Martin, P. M. (2011). Epstein-Barr virus as a marker of biological aggressiveness in breast cancer. *Br J Cancer* **104**(2), 332-7.
- Merchant, M., Swart, R., Katzman, R. B., Ikeda, M., Ikeda, A., Longnecker, R., Dykstra, M. L., and Pierce, S. K. (2001). The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol* **20**(6), 805-35.
- Middeldorp, J. M., and Pegtel, D. M. (2008). Multiple roles of LMP1 in Epstein-Barr virus induced immune escape. *Semin Cancer Biol* **18**(6), 388-96.
- Miyazaki, I., Cheung, R. K., and Dosch, H. M. (1993). Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* **178**(2), 439-47.

- Morris, M. A., Young, L. S., and Dawson, C. W. (2008). DNA tumour viruses promote tumour cell invasion and metastasis by deregulating the normal processes of cell adhesion and motility. *Eur J Cell Biol* **87**(8-9), 677-97.
- Mosialos, G. (2001). Cytokine signaling and Epstein-Barr virus-mediated cell transformation. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**(2-3), 259-70.
- Murono, S., Inoue, H., Tanabe, T., Joab, I., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Pagano, J. S. (2001). Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(12), 6905-10.
- Murray, P. G., Young, L. S., Rowe, M., and Crocker, J. (1992). Immunohistochemical demonstration of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein in paraffin sections of Hodgkin's disease. *J Pathol* **166**(1), 1-5.
- Najjar, I., Baran-Marszak, F., Le Clorennec, C., Laguillier, C., Schischmanoff, O., Youlyouz-Marfak, I., Schlee, M., Bornkamm, G. W., Raphael, M., Feuillard, J., and Fagard, R. (2005). Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. J Virol 79(8), 4936-43.
- Nakagomi, H., Dolcetti, R., Bejarano, M. T., Pisa, P., Kiessling, R., and Masucci, M. G. (1994). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* **57**(2), 240-4.
- Ning, S., Pagano, J. S., and Barber, G. N. (2011). IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun* **12**(6), 399-414.
- Nitta, T., Chiba, A., Yamashita, A., Rowe, M., Israel, A., Reth, M., Yamamoto, N., and Yamaoka, S. (2003). NF-kappaB is required for cell death induction by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Cell Signal* **15**(4), 423-33.
- O'Grady, J., Stewart, S., Elton, R. A., and Krajewski, A. S. (1994). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease and site of origin of tumour. *Lancet* **343**(8892), 265-6.
- Onnis, A., Navari, M., Antonicelli, G., Morettini, F., Mannucci, S., De Falco, G., Vigorito, E., and Leoncini, L. (2012). Epstein-Barr nuclear antigen 1 induces expression of the cellular microRNA hsa-miR-127 and impairing B-cell differentiation in EBV-infected memory B cells. New insights into the pathogenesis of Burkitt lymphoma. *Blood Cancer J* 2, e84
- Park, J. H., and Faller, D. V. (2002). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 induction by histone deacetylase inhibitors mediates induction of intercellular adhesion molecule-1 expression and homotypic aggregation. *Virology* **303**(2), 345-63.
- Parker, G. A., Crook, T., Bain, M., Sara, E. A., Farrell, P. J., and Allday, M. J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* **13**(12), 2541-2549.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, J. B., and Muller, C. W. (2006). Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell* **21**(4), 565-72.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., and Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* **304**(5671), 734-6.
- Pikarsky, E., Porat, R. M., Stein, I., Abramovitch, R., Amit, S., Kasem, S., Gutkovich-Pyest, E., Urieli-Shoval, S., Galun, E., and Ben-Neriah, Y. (2004). NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* **431**(7007), 461-6.
- Portis, T., Dyck, P., and Longnecker, R. (2003). Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **102**(12), 4166-78.
- Powles, T., Robinson, D., Stebbing, J., Shamash, J., Nelson, M., Gazzard, B., Mandelia, S., Moller, H., and Bower, M. (2009). Highly active antiretroviral therapy and the incidence of non-AIDSdefining cancers in people with HIV infection. *J Clin Oncol* **27**(6), 884-90.
- Punnett, A., Tsang, R. W., and Hodgson, D. C. (2010). Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol* **20**(1), 30-44.

Raab-Traub, N. (2002). Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. Semin Cancer Biol **12**(6), 431-41.

- Raab-Traub, N., and Flynn, K. (1986). The structure of the termini of the Epstein-Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell* **47**(6), 883-9.
- Raingeaud, J., Whitmarsh, A. J., Barrett, T., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). MKK3- and MKK6regulated gene expression is mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *Mol Cell Biol* **16**(3), 1247-55.
- Renne, C., Hinsch, N., Willenbrock, K., Fuchs, M., Klapper, W., Engert, A., Kuppers, R., Hansmann, M.
 L., and Brauninger, A. (2007). The aberrant coexpression of several receptor tyrosine kinases is largely restricted to EBV-negative cases of classical Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 120(11), 2504-9.
- Ribeiro, R. M., Mohri, H., Ho, D. D., and Perelson, A. S. (2002). In vivo dynamics of T cell activation, proliferation, and death in HIV-1 infection: why are CD4+ but not CD8+ T cells depleted? *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24), 15572-7.
- Rickinson, K. (2007). "Epstein-Barr virus. ." Fields Virology (H. P. M. Knipe D.M., Griffin B.D., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. and Straus S.E. , Ed.), 2 Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia.
- Robertson, E. S., Lin, J., and Kieff, E. (1996). The amino-terminal domains of Epstein-Barr virus nuclear proteins 3A, 3B, and 3C interact with RBPJ(kappa). *J Virol* **70**(5), 3068-74.
- Rosdahl, N., Larsen, S. O., and Clemmesen, J. (1974). Hodgkin's disease in patients with previous infectious mononucleosis: 30 years' experience. *Br Med J* **2**(5913), 253-6.
- Rothe, R., Liguori, L., Villegas-Mendez, A., Marques, B., Grunwald, D., Drouet, E., and Lenormand, J. L. (2010). Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J Biol Chem* **285**(26), 20224-33.
- Rothenberger, S., Bachmann, E., Berger, C., McQuain, C., Odermatt, B. F., and Knecht, H. (1997). Natural 30 base pair and 69 base pair deletion variants of the LMP1 oncogene do stimulate NF-kappaB-mediated transcription. *Oncogene* **14**(17), 2123-6.
- Rowe, M., Khanna, R., Jacob, C. A., Argaet, V., Kelly, A., Powis, S., Belich, M., Croom-Carter, D., Lee, S., Burrows, S. R., and et al. (1995). Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol* **25**(5), 1374-84.
- Saechan, V., Settheetham-Ishida, W., Kimura, R., Tiwawech, D., Mitarnun, W., and Ishida, T. (2010). Epstein-Barr virus strains defined by the latent membrane protein 1 sequence characterize Thai ethnic groups. *J Gen Virol* **91**(Pt 8), 2054-61.
- Saha, A., Halder, S., Upadhyay, S. K., Lu, J., Kumar, P., Murakami, M., Cai, Q., and Robertson, E. S. (2011). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C facilitates G1-S transition by stabilizing and enhancing the function of cyclin D1. *PLoS Pathog* **7**(2), e1001275.
- Salamon, D., Adori, M., Ujvari, D., Wu, L., Kis, L. L., Madapura, H. S., Nagy, N., Klein, G., and Klein, E. (2012). Latency type-dependent modulation of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 expression by type I interferons in B cells. J Virol 86(8), 4701-7.
- 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), 4150-60.
- Sandvej, K., Gratama, J. W., Munch, M., Zhou, X. G., Bolhuis, R. L., Andresen, B. S., Gregersen, N., and Hamilton-Dutoit, S. (1997). Sequence analysis of the Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein-1 gene and promoter region: identification of four variants among wildtype EBV isolates. *Blood* **90**(1), 323-30.
- Sandvej, K., Munch, M., and Hamilton-Dutoit, S. (1996). Mutations in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (BNLF-1) gene in spontaneous lymphoblastoid cell lines: effect on in vitro transformation associated parameters and tumorigenicity in SCID and nude mice. *Clin Mol Pathol* **49**(5), M290-7.
- Sandvej, K., Peh, S. C., Andresen, B. S., and Pallesen, G. (1994). Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and

benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas. *Blood* **84**(12), 4053-60.

- Santon, A., and Bellas, C. (2001). Deletions within the epstein-barr virus latent membrane protein-1 oncogene in adult ordinary, HIV-associated and paediatric Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma* **40**(3-4), 235-42.
- Santon, A., Manzanal, A. I., Campo, E., and Bellas, C. (1995). Deletions in the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in Hodgkin's disease. *Clin Mol Pathol* **48**(4), M184-7.
- Schmitz, R., Hansmann, M. L., Bohle, V., Martin-Subero, J. I., Hartmann, S., Mechtersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R., and Kuppers, R. (2009). TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. J Exp Med 206(5), 981-9.
- Schwaller, J., Tobler, A., Niklaus, G., Hurwitz, N., Hennig, I., Fey, M. F., and Borisch, B. (1995). Interleukin-12 expression in human lymphomas and nonneoplastic lymphoid disorders. *Blood* **85**(8), 2182-8.
- Shair, K. H., Schnegg, C. I., and Raab-Traub, N. (2009). Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 effects on junctional plakoglobin and induction of a cadherin switch. *Cancer Res* **69**(14), 5734-42.
- Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B., and Delecluse, H. J. (2006). Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* U S A **103**(18), 7065-70.
- Shao, N., Chen, L. H., Ye, R. Y., Lin, Y., and Wang, S. M. (2013). The depletion of interleukin-8 causes cell cycle arrest and increases the efficacy of docetaxel in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **431**(3), 535-41.
- Sheu, L. F., Chen, A., Lee, H. S., Hsu, H. Y., and Yu, D. S. (2004). Cooperative interactions among p53, bcl-2 and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Pathol Int* **54**(7), 475-85.
- Sides, M. D., Klingsberg, R. C., Shan, B., Gordon, K. A., Nguyen, H. T., Lin, Z., Takahashi, T., Flemington, E. K., and Lasky, J. A. (2011). The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor--beta1 synergistically induce epithelial--mesenchymal transition in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 44(6), 852-62.
- Sista, N. D., Barry, C., Sampson, K., and Pagano, J. (1995). Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* **23**(10), 1729-36.
- Sitki-Green, D., Covington, M., and Raab-Traub, N. (2003). Compartmentalization and transmission of multiple epstein-barr virus strains in asymptomatic carriers. *J Virol* **77**(3), 1840-7.
- Skinnider, B. F., Elia, A. J., Gascoyne, R. D., Patterson, B., Trumper, L., Kapp, U., and Mak, T. W. (2002). Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**(2), 618-26.
- Skinnider, B. F., and Mak, T. W. (2002). The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **99**(12), 4283-97.
- Slivnick, D. J., Ellis, T. M., Nawrocki, J. F., and Fisher, R. I. (1990). The impact of Hodgkin's disease on the immune system. *Semin Oncol* **17**(6), 673-82.
- Soni, V., Cahir-McFarland, E., and Kieff, E. (2007). LMP1 TRAFficking activates growth and survival pathways. *Adv Exp Med Biol* **597**, 173-87.
- Spacek, M., Hubacek, P., Markova, J., Zajac, M., Vernerova, Z., Kamaradova, K., Stuchly, J., and Kozak, T. (2011). Plasma EBV-DNA monitoring in Epstein-Barr virus-positive Hodgkin lymphoma patients. APMIS 119(1), 10-6.
- Spina, M., Carbone, A., Gloghini, A., Serraino, D., Berretta, M., and Tirelli, U. (2011). Hodgkin's Disease in Patients with HIV Infection. *Adv Hematol* **2011**.
- Szakonyi, G., Klein, M. G., Hannan, J. P., Young, K. A., Ma, R. Z., Asokan, R., Holers, V. M., and Chen, X.
 S. (2006). Structure of the Epstein-Barr virus major envelope glycoprotein. *Nat Struct Mol Biol* 13(11), 996-1001.

- Takada, K. (2012). Role of EBER and BARF1 in nasopharyngeal carcinoma (NPC) tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* **22**(2), 162-5.
- Tan, T. T., and Coussens, L. M. (2007). Humoral immunity, inflammation and cancer. *Curr Opin Immunol* **19**(2), 209-16.
- Tao, Y., Song, X., Deng, X., Xie, D., Lee, L. M., Liu, Y., Li, W., Li, L., Deng, L., Wu, Q., Gong, J., and Cao, Y. (2005). Nuclear accumulation of epidermal growth factor receptor and acceleration of G1/S stage by Epstein-Barr-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *Exp Cell Res* 303(2), 240-51.
- Thorley-Lawson (2005). "EBV persistence and latent infection in vivo." Epstein Barr Virus (R. E.S., Ed.) Caister Academic Press, Wymondham.
- Tirelli, U., Errante, D., Dolcetti, R., Gloghini, A., Serraino, D., Vaccher, E., Franceschi, S., Boiocchi, M., and Carbone, A. (1995). Hodgkin's disease and human immunodeficiency virus infection: clinicopathologic and virologic features of 114 patients from the Italian Cooperative Group on AIDS and Tumors. J Clin Oncol **13**(7), 1758-67.
- Toussirot, E., and Roudier, J. (2008). Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Rheumatol* **22**(5), 883-96.
- Tran, H., Nourse, J., Hall, S., Green, M., Griffiths, L., and Gandhi, M. K. (2008). Immunodeficiencyassociated lymphomas. *Blood Rev* **22**(5), 261-81.
- Trimeche, M., Korbi, S., Ziadi, S., Amara, K., Boniver, J., and de Leval, L. (2005). [Molecular characterization of Epstein-Barr virus associated with classical Hodgkin's lymphoma in Tunisia: prevalence of the LMP1 oncogene deletions and A and B viruses strains]. *Ann Biol Clin (Paris)* **63**(2), 193-9.
- Trivedi, P., Hu, L. F., Chen, F., Christensson, B., Masucci, M. G., Klein, G., and Winberg, G. (1994). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded membrane protein LMP1 from a nasopharyngeal carcinoma is non-immunogenic in a murine model system, in contrast to a B cell-derived homologue. *Eur J Cancer* **30A**(1), 84-8.
- Tsai, C. N., Tsai, C. L., Tse, K. P., Chang, H. Y., and Chang, Y. S. (2002). The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(15), 10084-9.
- Tsao, S. W., Tramoutanis, G., Dawson, C. W., Lo, A. K., and Huang, D. P. (2002). The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* **12**(6), 473-87.
- Ushmorov, A., Leithauser, F., Sakk, O., Weinhausel, A., Popov, S. W., Moller, P., and Wirth, T. (2006). Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **107**(6), 2493-500.
- Vaccher, E., Spina, M., and Tirelli, U. (2001). Clinical aspects and management of Hodgkin's disease and other tumours in HIV-infected individuals. *Eur J Cancer* **37**(10), 1306-15.
- Vockerodt, M., Morgan, S. L., Kuo, M., Wei, W., Chukwuma, M. B., Arrand, J. R., Kube, D., Gordon, J., Young, L. S., Woodman, C. B., and Murray, P. G. (2008). The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* **216**(1), 83-92.
- Vrzalikova, K., Vockerodt, M., Leonard, S., Bell, A., Wei, W., Schrader, A., Wright, K. L., Kube, D., Rowe, M., Woodman, C. B., and Murray, P. G. (2011). Down-regulation of BLIMP1alpha by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. *Blood* **117**(22), 5907-17.
- Walling, D. M., Shebib, N., Weaver, S. C., Nichols, C. M., Flaitz, C. M., and Webster-Cyriaque, J. (1999).
 The molecular epidemiology and evolution of Epstein-Barr virus: sequence variation and genetic recombination in the latent membrane protein-1 gene. J Infect Dis 179(4), 763-74.
- Wan, J., Zhang, W., Wu, L., Bai, T., Zhang, M., Lo, K. W., Chui, Y. L., Cui, Y., Tao, Q., Yamamoto, M., Akira, S., and Wu, Z. (2006). BS69, a specific adaptor in the latent membrane protein 1mediated c-Jun N-terminal kinase pathway. *Mol Cell Biol* 26(2), 448-56.

- 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), 831-40.
- Wang, F., Gregory, C., Sample, C., Rowe, M., Liebowitz, D., Murray, R., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus latent membrane protein (LMP1) and nuclear proteins 2 and 3C are effectors of phenotypic changes in B lymphocytes: EBNA-2 and LMP1 cooperatively induce CD23. J Virol 64(5), 2309-18.
- Wang, X., Kenyon, W. J., Li, Q., Mullberg, J., and Hutt-Fletcher, L. M. (1998). Epstein-Barr virus uses different complexes of glycoproteins gH and gL to infect B lymphocytes and epithelial cells. *J Virol* **72**(7), 5552-8.
- Wang, Z., Luo, F., Li, L., Yang, L., Hu, D., Ma, X., Lu, Z., Sun, L., and Cao, Y. (2010). STAT3 activation induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein1 causes vascular endothelial growth factor expression and cellular invasiveness via JAK3 And ERK signaling. *Eur J Cancer* **46**(16), 2996-3006.
- Weniger, M. A., Melzner, I., Menz, C. K., Wegener, S., Bucur, A. J., Dorsch, K., Mattfeldt, T., Barth, T.
 F., and Moller, P. (2006). [Mutations of the tumor suppressor gene SOCS-1 in classical Hodgkin lymphoma are frequent and associated with nuclear phospho-STAT5 accumulation]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **90**, 210-5.
- Wistinghausen, B., Gross, T. G., and Bollard, C. (2013). Post-Transplant Lymphoproliferative Disease in Pediatric Solid Organ Transplant Recipients. *Pediatr Hematol Oncol*.
- Wlodarska, I., Nooyen, P., Maes, B., Martin-Subero, J. I., Siebert, R., Pauwels, P., De Wolf-Peeters, C., and Hagemeijer, A. (2003). Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* **101**(2), 706-10.
- Woellmer, A., and Hammerschmidt, W. (2013). Epstein-Barr virus and host cell methylation: regulation of latency, replication and virus reactivation. *Curr Opin Virol*.
- Xicoy, B., Ribera, J. M., Miralles, P., Berenguer, J., Rubio, R., Mahillo, B., Valencia, M. E., Abella, E., Lopez-Guillermo, A., Sureda, A., Morgades, M., Navarro, J. T., and Esteban, H. (2007). Results of treatment with doxorubicin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine and highly active antiretroviral therapy in advanced stage, human immunodeficiency virus-related Hodgkin's lymphoma. *Haematologica* **92**(2), 191-8.
- Yajima, M., Kanda, T., and Takada, K. (2005). Critical role of Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded RNA in efficient EBV-induced B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* **79**(7), 4298-307.
- Yoshimoto, T., Nagase, H., Yoneto, T., Inoue, J., and Nariuchi, H. (1998). Interleukin-12 expression in B cells by transformation with Epstein-Barr virus. *Biochem Biophys Res Commun* **252**(3), 556-60.
- Yoshizaki, T. (2002). Promotion of metastasis in nasopharyngeal carcinoma by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1. *Histol Histopathol* **17**(3), 845-50.
- Yoshizaki, T., Horikawa, T., Qing-Chun, R., Wakisaka, N., Takeshita, H., Sheen, T. S., Lee, S. Y., Sato, H., and Furukawa, M. (2001). Induction of interleukin-8 by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 and its correlation to angiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* **7**(7), 1946-51.
- Yoshizaki, T., Kondo, S., Wakisaka, N., Murono, S., Endo, K., Sugimoto, H., Nakanishi, S., Tsuji, A., and Ito, M. (2013). Pathogenic role of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in the development of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett*.
- Young, L. S., and Murray, P. G. (2003). Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 22(33), 5108-21.
- Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* **4**(10), 757-68.
- Zerby, D., Chen, C. J., Poon, E., Lee, D., Shiekhattar, R., and Lieberman, P. M. (1999). The aminoterminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biol* **19**(3), 1617-26.

- Zhou, X. G., Sandvej, K., Li, P. J., Ji, X. L., Yan, Q. H., Zhang, X. P., Da, J. P., and Hamilton-Dutoit, S. J. (2001). Epstein--Barr virus gene polymorphisms in Chinese Hodgkin's disease cases and healthy donors: identification of three distinct virus variants. *J Gen Virol* **82**(Pt 5), 1157-67.
- Zuercher, E., Butticaz, C., Wyniger, J., Martinez, R., Battegay, M., Boffi El Amari, E., Dang, T., Egger, J.
 F., Fehr, J., Mueller-Garamvogyi, E., Parini, A., Schaefer, S. C., Schoeni-Affolter, F., Thurnheer,
 C., Tinguely, M., Telenti, A., and Rothenberger, S. (2012). Genetic Diversity of EBV-Encoded
 LMP1 in the Swiss HIV Cohort Study and Implication for NF-Kappab Activation. *PLoS One* 7(2), e32168.
- Zur Hausen, A., van Rees, B. P., van Beek, J., Craanen, M. E., Bloemena, E., Offerhaus, G. J., Meijer, C. J., and van den Brule, A. J. (2004). Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol* **57**(5), 487-91.

Annexe I : Notice d'information et de consentement destinée aux patients séropositifs VIH

Etiquette patient a coller
Ou
Nom :
Prénom :

Notice d'information et de consentement destinée aux patients infectés par le VIH en vue d'une collection d'échantillons biologiques

Madame, Monsieur,

Nous avons besoin de constituer une collection de sérums et de salives de patients témoins, infectés par le VIH, mais non porteurs de lymphome de Hodgkin, dans le cadre d'une étude portant sur le lymphome de Hodgkin et le rôle du virus d'Epstein-Barr dans son développement.

Nous aimerions, à l'occasion de votre bilan de suivi à l'Hôpital de Jour, recueillir avec votre consentement un peu de votre salive et un tube de sang supplémentaire, échantillons qui serviront de témoins ou contrôles pour notre étude. Cependant, vous êtes tout à fait libre de refuser ces prélèvements sans que cela ait de conséquence pour votre suivi.

Nous vous proposons donc un prélèvement de salive effectué, avec votre accord, à l'aide d'une Salivette®. Il vous sera simplement demandé pour cela de mâcher un petit rouleau de coton pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce que le coton soit bien imbibé de votre salive.

Au cours du bilan sanguin effectué dans le cadre de votre suivi, **nous aimerions également pouvoir récupérer un tube de sang** supplémentaire permettant de préparer des échantillons de sérum destinés à notre étude.

Ces échantillons seront conservés au laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble en attendant leur utilisation pour l'étude scientifique présentée ci-dessus.

Vous pourrez à tout moment exprimer votre opposition à leur utilisation à des fins de recherche en adressant un courrier d'opposition à l'adresse suivante :

Pr Patrice Morand Laboratoire de Virologie IBP R+3 Hôpital Michallon BP 217 38043 Grenoble Cedex 9

Aucun examen de vos caractéristiques génétiques ne sera réalisé sur ces échantillons dans le cadre de cette étude.

J'autorise la conservation de mes prélèvements de sang et de salive dans le but de réaliser les recherches présentées dans la notice: □ OUI □ NON

Fait àle.....le.

Signature :

Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du Code civil), ces prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice.

Annexe II : Notice d'information et de consentement destinée aux patients atteints d'un lymphome de Hodgkin et séronégatifs pour le VIH

Etiquette patient à coller Ou Nom : Prénom :

Notice d'information et de consentement destinée aux patients atteints de lymphome de Hodgkin et non infectés par le VIH, au cours de leur première visite de suivi.

Madame, Monsieur,

Vous êtes porteur/porteuse d'un lymphome de Hodgkin. L'origine de ce lymphome n'est pas encore clairement élucidée. Elle implique certainement différents facteurs tels qu'environnementaux, inflammatoires et infectieux. Des études ont montré un risque plus élevé de développer cette maladie chez les personnes ayant été en contact avec le virus d'Epstein-Barr. L'objectif de notre étude est d'étudier le rôle du virus d'Epstein-Barr (EBV) dans le développement d'un lymphome de Hodgkin. Il existe en effet différents variants de ce virus, dont certains sont suspectés de favoriser la cancérisation des lymphocytes et donc de permettre le développement de lymphomes de Hodgkin plus agressifs. Nous allons étudier les différents variants pour améliorer notre compréhension de la cancérogenèse du lymphome de Hodgkin.

Afin de pouvoir constituer une collection d'échantillons biologiques issus de patients atteints d'un lymphome de Hodgkin et non infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH), **nous aimerions, au cours de cette première visite de prise en charge de votre lymphome, recueillir un peu de votre salive**. Nous vous proposons donc un prélèvement de salive effectué, avec votre accord, à l'aide d'une Salivette[®]. Il vous sera simplement demandé pour cela de mâcher un petit rouleau de coton pendant 2 à 3 minutes jusqu'à ce que le coton soit bien imbibé de votre salive.

Au cours du bilan sanguin qui sera effectué dans le cadre de votre diagnostic, **nous aimerions également pouvoir récupérer un échantillon de sang** permettant de préparer des tubes de sang total, de cellules sanguines et de plasma destinés à notre étude.

Ces échantillons seront conservés au laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble en attendant leur utilisation pour l'étude scientifique présentée ci-dessus. Vous pourrez à tout moment exprimer votre opposition à leur utilisation à des fins de recherche en adressant un courrier d'opposition à l'adresse suivante :

Pr Patrice Morand Laboratoire de Virologie IBP R+3 Hôpital Michallon BP 217 38043 Grenoble Cedex 9 Un prélèvement par une biopsie ou une exérèse chirurgicale de votre lésion a été réalisé ou sera réalisé. Ce prélèvement est nécessaire pour établir le diagnostic de cette lésion et adapter le traitement qui vous sera proposé. Au cas où ce prélèvement n'ait pas été utilisé en totalité, le prélèvement restant sera stocké, sauf opposition de votre part, au Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU de Grenoble.

Nous aimerions alors utiliser, avec votre accord, une partie du prélèvement restant pour notre étude sur l'impact du virus EBV dans la survenue du lymphome de Hodgkin.

Vous pourrez exprimer votre opposition à cette utilisation, à tout moment, auprès de l'équipe médicale, ou en adressant un courrier d'opposition à l'adresse suivante :

CRB du CHU de Grenoble RDC Bas BP 217 38043 Grenoble Cedex 9

Aucun examen de vos caractéristiques génétiques ne sera réalisé sur ces échantillons dans le cadre de cette étude.

J'autorise la conservation de mes	prélèvements	de sang e	et de	salive	dans	le	but	de	réaliser	les
recherches présentées dans la notice	e: □ O	IL			NC					

J'autorise qu'une partie du prélèvement de ma lésion soit utilisée dans le cadre de cette étude après que tous les examens diagnostiques nécessaires aient été effectués :

□ NON

Nom et prénom du patient :	(en lettres
capitales)	
Je reconnais avoir reçu l'information sur cette étude	par le Dr
Fait àI	e

Signature :

Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du Code civil), ces prélèvements ne pourront être cédés à titre commercial ni donner lieu à une rémunération à votre bénéfice.

MID 1 :	ACGAGT	MID 19 :	CGAGCA	MID 37 :	TGTCGA
MID 2 :	TGAGAT	MID 20 :	CGTGCG	MID 38 :	TACTCG
MID 3 :	CATCTG	MID 21 :	CTAGAC	MID 39 :	TACAGT
MID 4 :	ACACTC	MID 22 :	CTCTAG	MID 40 :	TATGAC
MID 5 :	ACTGAC	MID 23 :	ACGTCG	MID 41 :	TAGTAC
MID 6 :	AGACTC	MID 24 :	ACAGAT	MID 42 :	CATAGT
MID 7 :	AGCGCA	MID 25 :	ACTATG	MID 43 :	CAGACA
MID 8 :	AGTAGC	MID 26 :	AGATCG	MID 44 :	CACGAT
MID 9 :	ATCGTC	MID 27 :	AGCTGT	MID 45 :	CGATGT
MID 10 :	ATGCTA	MID 28 :	AGTCTG	MID 46 :	CGCAGA
MID 11 :	TCGCTA	MID 29 :	ATCAGA	MID 47 :	CGTATA
MID 12 :	TCAGCT	MID 30 :	ATATCG	MID 48 :	CTACGT
MID 13 :	TCTCGT	MID 31 :	ATGACT	MID 49 :	CTGTCA
MID 14 :	TGCATC	MID 32 :	TCGACG	MID 50 :	CTGAGC
MID 15 :	TGTGAT	MID 33 :	TCATGA		
MID 16 :	TAGCGT	MID 34 :	TCTGCA		
MID 17 :	CAGTCG	MID 35 :	TGACGA		
MID 18 :	CACATC	MID 36 :	TGCTAG		

Annexe III : Liste des MID utilisés pour identifier les échantillons cliniques lors du séquençage

Annexe IV : Totalité des séquences de LMP1 détectées par le séquençage nouvelle génération

Cohorte LYMPHOVIR : sang total (1)

	314	315	317	319		322	3	324 32	6	327	32	8	330		331	33	33	334	335	336	33	88	34	2 34	4 346	6 3	48	3	49	35	2 3	53	35	5	356	35	57	358	359 3	61 36	65	366	370	373	375	376 377
	А	G	D	G		Q		ΤE		V	E		к		G	(D	Q	G	Р	L	-	G	i G	н		н	1	D	н		G	G		D	F	,	н	L	тс	3	s	G	D	D	РН
		-	N/E	D	E/N,	/K/T/D/	н	Q		А	Q/	н	Q	,	A/Q			R	S	s	S/	P		s		N	I/D		A	N/	R	D	C/	'I		5	;	Р	н			T/A		Y	Е	N
															,				-					-		-							- 1									<u> </u>				
	6	9	~ ~	ы		9 9	n	0 0	, ,	- 0	6		ω ,	- 0	6	4	e	0	~~~~	۱	م م	0 1	. u	, ,		6		ß	4		9	m	~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~			2	0	∞	ы	00 U	، م	Ω 4	ц.	4	9	м и
	837	837	837	836	835	835		835	6	834	833	833	833	833	832	832	832	832	831	831				829	828	827	827	827	827	826	826	826	825	825	825	825	825	824	824	833	770	822	821	820	819	819
	16	16	16	16	16	16	7	16 16		16 16	16	16	16	16 16	16	16	16	16	16	16	101	191	191	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16 16	16	16	16	16	16	16	16	9	16 16	16	16	16	16 16
B95-8	Т	А	G T	G	С	A A	4	C G	1	ГТ	G	А	A A	A G	G	G	Α	Α	G	С	гт	G	i A	G	С	С	Т	Α	Т	С	А	G	G G	Т	Т	С	А	А	Т	G 1	Г	т с	Т	G	С	с с
LH/VIH1					А	Т	-											G	А		C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH1											С																								С							A				
LH/VIH3			A		G											*	*	*	*	*	* *	*	• *	*	*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*						A		G				
LH/VIH4					А	т	-											G			C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH4						т												G			C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH6					G													G			C	2	т	-		G					G									A		A				
LH/VIH6					А	Т	-											G			C	2	т	-		G					G									A		A				т
LH/VIH6					А	Т	-											G			C	2	т	-		G					G									A		A				
LH/VIH6					G													G			C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH6					G													G	А	т	C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH6					G													G	А		C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH6					А	т	-											G	А	т	C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH6					А	Т	-											G	А		C	:			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH7					А	Т												G	А		C	:			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH8					А	Т	-											G	А		C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*							,	A				
LH/VIH8					А	Т	-											G							*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*												
LH/VIH9					А	Т												G			C	:			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH11					А	Т	-											G			C	2			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*							,	A				
LH/VIH11																		G			C	2	т	-							G									A		A				
LH/VIH11																					C	2	т	-							G									A		A				
LH/VIH11																																			С	т						A				
LH/VIH11					G			С										G			C	2	т	-							G									A		A				
LH/VIH11																		G			C	2	т	-							G									A		A				
LH/VIH11					G			С																											С	т						A				
LH/VIH11					G			С										G			C	2	т	-											С	т						A				
LH/VIH11					G			С										G			C	2	т	-							G				С	т						A				
LH/VIH11					G			С										G																	С	т						A				
LH/VIH11					G																														С	т						A				
LH/VIH11					G	т	-											G			C	2				А					G									A		G				
LH/VIH11					G	т	-											G			c	:	т								G									A		G				
LH/VIH12					G													G			C	:	Т								G									A		A				
LH/VIH12			А		G										С	*	*	*	*	*	* *	*	• •	*	*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*						A		G				
LH/VIH12					Α	с								с	А						<u>c</u>	:	Т	-						А								с				A				
LH/VIH13					А	Т												G			C	:			*	*	*	*	*	*	*	*	* *	*								A				
LH/VIH14											С																								С							A				
LH/VIH14					G													G			C	:	т	-							G									A		A				
LH/VIH14											с																								с		G					А				

Cohorte LYMPHOVIR : sang total (2)

	314	315	3	17	319		322	32	24 3	326	327		328	3	330	331		333	334	335	336		338	3	342 3	44 3	46	348		349	35	2 3	353	3	55	356	5 3	57	358	359	361	365	366	370	373	375	376	377
	А	G		D	G		Q	٦	Г	Е	V		Е		к	G		D	Q	G	Р		L		G	G	н	Н		D	F	I	G		G	D		Р	н	L	т	G	S	G	D	D	Р	н
			N	/E	D	E/N/	K/T/D/	Ή	0	Q	Α		Q/H		Q	A/Q			R	S	S		S/P			S		N/D		А	N/	′R	D	0	:/I			S	Р	Н			T/A		Y	Е		Ν
	168379	168376	168372	168370	168365	168357	168356 168355	CCCODT	1055501	168345	168341	168340	168339 168337	168333	168331	168330 168329	168324	168323	168320	168318	168315	168309	168308	168307	168295	168291	168285	168279 168277	168275	168274	168267	168266	168263	168258	168257	168253	168252	168250	168248	168245	168238	168226	168225 168224	168211	168204	168196	168193	168192
95-8	т	А	G	т	G	С	A A	4 (c .	G	т	T (G A	А	А	G G	G	А	А	G	С	т	т	G	А	G	С	с т	A	т	С	А	G	G	G .	гт	С	Α	А	т	G	т	т с	т	G	С	С	С
H/VIH17						G													G				С		т							G									А		А					
H/VIH17						G													G				с		т			G				G									А		А					
H/VIH18						А	Т	Г											G				С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	ĸ							А					
H/VIH18						А													G				С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	*					Α		G					
H/VIH19						G													G				С		Т											C					Α		А					
H/VIH31											C	G													т								A	А	ти	4							А					
H/VIH31											C	G											С		т								A	А	т	4							А					
H/VIH31											0	G											С		т				С			G									А		А					
H/VIH31											C	G													т								A	А	Т	4					А		A					
H/VIH31											C	G							_						Т							G											A					
H/VIH31											(G							G				С		т				С			G			_						А		A					
H/VIH31											(G							G				C		1 -								A	A	- 1 -	а							A					
											,	6	c						G						1								А	А		۹ د							A					
						G						د	C												т								^	^	т.	, C							A A					
						G					,	0													т т								Δ	Δ	т, т,	- -							Δ					
H/VIH31						G													G				c		т				c			G	~	A	. ,	•					Δ		Δ					
H/VIH31						G													G				C		т				Ū			0	А	А	т	4							A					
H/VIH32						A													G				с				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	k .							А					-
H/VIH32						А	т	г					с										с				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	ĸ							А					
H/VIH32						А	т	г					с																							с							А					
H/VIH32						А	т	Г					с						G				С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	ĸ							А					
H/VIH32						А	т	Г															С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	ĸ							А					
H/VIH32						А	т	Г																			*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	ĸ							А					
H/VIH32						А	т	Г																												С							А					
H/VIH32						А	т	Г																																			А					
H/VIH32						А	т	Г											G				С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	*							А					
H/VIH32						А	т	Г											G								*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	k							А					
H/VIH32						А	Т	Г											G				С				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	* C							A					
H/VIH32						A	Т	Γ											G				С		_											С							A					
H/VIH32						A	Т	Г _											G				С		т											С							A					
H/VIH32						A	I						~						G																	C							A					
													c c										~				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :	۲ ۲							A					
													c c										C				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :								A					ļ
н Л/нзэ													c c															-	-	-	-	-		-									Δ					
H/VIH32													c c						G				c				*	* *	*	*	*	*	*	*	* :								Δ					
H/VIH32													c						G				2													c							A					
H/VIH32													-						G																	c							A					
H/VIH32																			G				с				*	* *	*	*	*	*	*	*	*	*							А					

Cohorte LYMPHOVIR : sang total (3)

	314	315	317	319		322	324	326	32	27	328	330	331	333	334	4 335	336	3	38	34	2 344	346	348	34	19	352	353	355		356	35	73	58 3	359 3	361 30	55 36	66	370 3	373 3	375 3	76 377
	А	G	D	G		Q	Т	Е	V	/	Е	К	G	D	Q	G	Р		L	G	i G	н	н	D)	н	G	G		D	Р	· · · ·	н	L	т	G 5	5	G	D	DI	ΡH
			N/E	D	E/N,	/K/T/D/H	1	Q	A	1	Q/H	Q	A/Q		R	S	S	S	/P		S		N/D	A	A	N/R	D	C/I			S		Р	Н		Т/	/Α		Y	Е	Ν
	168379	168376	168372	168365	168357	168356 168355	168350	168345	168341	168340	168339 168337	168333 168333 168331	168330 168329	168324	168320	168318	168315	168309	168308	16830/ 168305	168291	168285	168279	168275	168274	168267 168266	168263	168258 168257	168256	168253	168252	168250	168248	168245	168238	168225 168225	168224	168211	168204	168196	168193 168192
395-8	Т	А	G T	G	С	A A	С	G	т	Т	G A	A A	G G	G A	A	G	С	т	тс	G A	G	С	СТ	A	Т	C A	G	G G	Т	т	С	A	A	Т	G '	гτ	С	Т	G	C (с с
H/VIH21											С																			С				А		А					
H/VIH23					Α	Т									G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							А					
H/VIH23						Т									G				с			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							Α					
H/VIH24					G										G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*						A	G					
H/VIH26					G										G				С	Т						G					Т				А	Α					
H/VIH28			А	Α											G				С	Т						G		Т							A	Α					
H/VIH34					Α	Т									G	Α			С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							Α					
H/VIH35					Α	Т									G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							Α					
H/VIH35											С																			С						Α					
H/VIH35											С				G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							Α					
H/VIH38					Α	Т									G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							Α					
H/VIH39					G										G				С		A	*	* *	*	*	* *	*	* *	*						A	G					
.H/VIH41					Α	Т									G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							A			Т		
H/VIH42					A	Т									G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							A					
H/VIH42					Α	Т						C			G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							A					
H/VIH43					G										G				С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*						A	G					
H/VIH44					A	Т									G	A			С			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							A					
H/VIH44					A	Т			С						G	A			С																	A					
H/VIH45					G						_				G				С	T	-			С		G									A	A					
H/VIH46											C											*	* *	*	*	* *	*	* *		C						A					A
H/VIH47					~						C											*							÷	C						A					
H/VIH47					G						C											*	* *	*	*	* *	*	* *	*	C						A					
					G										~				~			*	* *	*	*	* *	*	* *	*	c						A					
					G										6				C			*	* *	*	*	* *	*	* *	*	c						A					
					0						c				G				c	т										c						A 					
											c								C	т т										c						A A					
											c				G				c	т Т										c						^					
н///нд7											C				G				c c	т т										c						Δ					
H/VIH47					G										G				c	т Т										c						Δ					
H/VIH49		С			A	т									ี ด				c	- '		*	* *	*	*	* *	*	* *	*	2						A					
H/VIH50		c			A	т									<u>ร</u>				c			*	* *	*	*	* *	*	* *	*							A					
H/VIH51		-									с с																			С						A				A	

Cohorte LYMPHOVIR : cellules oropharyngées (1)

	314	315	317	319		322	324	326	327	32	28	330	331	333	334	335	336	3	38	342	344	346	348	349	3	52	353	35	5	356	35	7 35	8 359	361	365	366	370	373	375	376	377
	А	G	D	G		Q	Т	Ε	V	1	E	Κ	G	D	Q	G	Р		L	G	G	Н	Н	D		Н	G	G		D	Р	ł	ΙL	Т	G	S	G	D	D	Р	Н
			E	D		E/N	М	Q		Q	/н	Ν	Q	H/A	R	S		S/'	Y/P				N/Q	Α		R	D				S					T/A/N		Y	Ε		1
	79	76	72	65	57	56	20	45	41	39	37	31	30 29	24	20	18	15	60	07	95	91	85	62	75	67	99	63	82		23	22	20	42 4	88	26	25	11	04	96	93	92
	83.	.83	83.	83	83	83	83	83	83.	83.	83.	83.0	83.83	83.83	83	83	83	83	83.0	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82	82,02	82	82	82	82	82	81	81	81
	16	. 16	10	16	16	10	16	16	10	16	10	10 10	16	16	.16	16	16	10	10	.16	16	16	10	10	10	. 16	16	10	16	16	16	10	191	16	16	16	16	16	16	16	16
B95-8	I	A	GI	G	0	A A	С	G		G	A A	A A	GG	GΑ	A	G	C	I	I G	A	G	C	CΙ	A		A	G	GG		I	C	A A		G		1 0		G	C	C	С
					G										G				C	I						G				-				A		A					
			А		G					c																				c						A					
					c					C				* *	*	*	*	*	* *	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	*	C				٨		A C					
			A		6										G				r	т			Δ											A		0					
					0										0				<u> </u>	<u> </u>			~							C	т					Δ					
																														c	т			Δ		Δ					
LH/VIH11																										G				C				Δ		Δ					
LH/VIH11					G			с							G				с	т						G								A		A					
LH/VIH11					G			c																						с	т					A					
, LH/VIH11					G																									C	т										
LH/VIH14										С																				С						А					
LH/VIH19					А	Т									G				С			*	* *	* :	* *	*	*	* *	*					Α		А					
LH/VIH19					А	т									G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*							А					
LH/VIH19															G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*					Α		А					
LH/VIH19															G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*							А					
LH/VIH19					G										G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*					Α		А					
LH/VIH19					G										G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*							А					
LH/VIH19					А	Т									G				С	Т			G			G								Α		А					
LH/VIH19					А	Т									G				С	Т						G								Α		А					
LH/VIH19															G				С	Т			G			G								Α		А					
LH/VIH19															G				С	Т						G								Α		А					
LH/VIH19															G				С	Т			G			G										А					
LH/VIH19					G										G				С	Т						G								Α		А					
LH/VIH19					G										G				С	Т			G			G								Α		А					
LH/VIH19					G										G				С	Т			G			G										А					
LH/VIH19					G										G				С	Т						G								Α		А					
LH/VIH19					G										G				С	Т						G										А					
LH/VIH23					A	Т									G				с			*	* *	* '	* *	*	*	* *	*							A					
LH/VIH23						Т									G				С			*	* *	* *	* *	*	*	* *	*							А					
LH/VIH24					G										G				С			*	* *	* `	* *	*	*	* *	*					A		G					
LH/VIH24					G										G				С	Т										С						А					
LH/VIH26					G						_				G				C	Т						G					Т			A		Α					
LH/VIH29					G										G				C	Т						G								A		Α					

Cohorte LYMPHOVIR : cellules oropharyngées (2)

	314	315	317	319		322	324	326	32	7	328	33	0	331		333	334	335	5 336	5	338	3	342	344	346	34	18	34	9	352	353		355		356	357	35	8 359	93	61 36	<u> </u> 55	366	37	37	3 37	5 37	5 377
	Α	G	D	G		Q	Т	Е	V		Е	K		G		D	Q	G	Р		L		G	G	Н	F	1	D)	Н	G		G		D	Р	Н	L		ΤC	3	S	G	D	D	Р	Н
			E	D		E/N	М	Q			Q/H	N		Q		H/A	R	S			S/Y/	Ρ				N/	'Q	Α		R	D		1			S						T/A/N	J	Y	E		
	379	376	372	365	357	356 355	350	345	341	340	339	333	31	330	529	324 323	320	318	315	6	50 80 80	307	95	191	85	179	17	275	74	, e /	63	58	57	56	233	52	9 8	45		222	27	25	11	5	96	93	192
	683	683	689	689	683	683	683	683	689	689	683	683	683	689	20	683	683	683	683	ģ	683	683	682	683	682	683	683	683	683	682	682	683	683	89	682	682	682	682		80.0	00	682	682	682	681	681	681
B95-8	T	A	GI	- -	<u>с</u>			G	<u>т</u>	<u>т</u>	G A	A	A	G	G	G A		G		-		G	A	G	<u>с</u>	<u> </u>	<u>т</u>	A	<u>т</u>		G	G	G	<u>т</u>	<u>т</u>	C A					<u>-</u> '	T (<u></u>	G			с С
LH/VIH31	-									G				-	-						<u> </u>		Т								A	Ā	T	A									· ·			-	-
LH/VIH31										G													т					с		G										A		A					
LH/VIH31										G													т								А	А	Т	A						A		A					
LH/VIH31										G													т								А	А	Т	A								A					
LH/VIH31										G													т					С		G										A		A					
LH/VIH31										G							G				С		т								Α	А	Т	A								A					
LH/VIH31										G							G				С		т					С		G										A		A					
LH/VIH31										G							G						т								А	А	T.	A								A					
LH/VIH31																							т								Α	А	Т	A								A					
LH/VIH31																	G				С		т					С		G												A					
LH/VIH31					G					G													т								Α	А	Т	A								A					
LH/VIH31					G					G							G				C		т					С		G												A					
LH/VIH31					G					G											_		Т					С		G												A					
LH/VIH31					G																С		T					С		G			_									A					
LH/VIH31					G												~				~		1 -					~		~	A	A	1.	A								A					
					G												G				C		1 T					c		G										A ^		A					
					G												c				c		- -					C		G	^	^	т	^						А		A ^					
					G												G				c c		Ť					c			A A	A A	т	A A								A A					
					G												G				c c		Ť					c		G	~	~		~						^		^					
1H/VIH31					G												G				c		Ť					c		G												Δ					
LH/VIH31					G												G				Ũ		т					C		0	А	А	т	А								A					
LH/VIH31					G												G						т					с		G										A		A					
LH/VIH32					Α	Т					С																								С							A					
LH/VIH32					А	т					С						G				С				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32					А	Т															С				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32					А	т																													С							A					
LH/VIH32					А	т											G				С				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32					А	т											G				С														С							A					
LH/VIH32											С										С				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32											С														*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32											С																								С							A					
LH/VIH32											С						G				C				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
LH/VIH32											С																								С							A					
LH/VIH32																	G				С				*	*	*	*	*	* *	*	*	*	*								A					
Cohorte LYMPHOVIR : cellules oropharyngées (3)

	314	315	317	319	m	22	324	326	327	328	8 3	330	331	333	334	335	336	338		342	344	346	348	349	352	353	35	5	356	357	358	359	361 3	365	366	370	373	375 3	76 377
	Α	G	D	G		Q	Т	E	V	E		Κ	G	D	Q	G	Р	L		G	G	Н	Н	D	н	G	(ì	D	Р	Н	L	Т	G	S	G	D	D	ΡH
			E	D	E	/N	М	Q		Q/H	1	Ν	Q	H/A	R	S		S/Y/I	>				N/Q	Α	R	D				S					T/A/N		Y	Е	
	379	376	372 870	365	357	356 355	350	345	341 340	339	337 333	31	330 329	324 323	320	318	315	608 808	307	95	91	85	179	275 274	67	63	58	56	53	52	148	245	38	26	25	11	204	96	193 192
	1683	1683	1683 1683	683	1683	1683 1683	1683	1683	1683 1683	1683	1683 1683	683	1683 1683	1683 1683	1683	1683	1683	1683 1683	1683	1682	1682	1682	1682 1682	1682 1682	1682	1682	682	1682	1682	1682	682	1682	1682	1682	1682	1682	1682	1681	l681
B95-8	Т	A	G T	G	С	A A	С	G	TT	G	A A	A	GG	G A	A	G	c	TT	G	A	G	С	C T	A T	C /	4 G	G	<u>с</u> 3 Т	T	C A		Т	G	T	тс	T	G	C	<u>c</u> c
LH/VIH33			A		G		Т							* *	*	*	*	* *	*	*	*	*	* *	* *	* :	* *	* *	*						G	G				
LH/VIH34					Α	Т									G	Α		С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*					А		A				
LH/VIH34					А	Т									G	Α		С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*							А				
LH/VIH34					А	Т									G	А		С		Т					(3							А		A				
LH/VIH34					А	т								С								*	* *	* *	* :	* *	* *	*							A				
LH/VIH34					Α	Т								С						Т					(3							А		A				
LH/VIH34					G										G	Α		С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*					А		A				
LH/VIH34					G										G	А		С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*							A				
LH/VIH34					G										G	А		С		Т					(3							А		A				
LH/VIH34					G									C				С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*							A				
LH/VIH34					G									С								*	* *	* *	* :	* *	* *	*							A				
LH/VIH34					G									С						Т					(3							А		A				
LH/VIH34					G									C						Т					(6									A				
LH/VIH38					Α	Т									G			С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*							A				
LH/VIH40					A								C A					C C		Т															A				
LH/VIH41					G							Т		С	G	A		С	A	т					0	5									A		т		
LH/VIH41					A	Т						Т		С	G	A		C	A	Т					(5									A		т		
LH/VIH41					A	T									G			С				*	* *	* *	* *	• •	* *	*							A				
LH/VIH41	<u> </u>	-			G	_									G			C				*	* *	* *	* *	* *	* *	*							<u>A</u>				
LH/VIH49		C			A	T					~				G			C				ŕ	* *	* *	* :	• *	* *	• *	-						A				
										C C	L C																		C						A			A	
					^	т				ι	ι				6							*	* *	* *	* :	k *	* *	*	ι						A			А	
					A 	- т т									G	٨		с С				*	* *	* *	* :	* *	* *	*							<u> </u>				
					G										6	А				т						,							٨		^				
LEI/VIE50	1				U										U			L		1						J							А		м				

Cohorte LYMPHOVIR : cellules oropharyngées (4)

	314	315	317	319	322	2	324	326	327	328	3	30	331	3	3	334	335	336	3	38	342	344	346	34	8	349	35	2 3	53	355		356	357	358	359	361	365	366	370	373	375	376	377
	Α	G	D	G	Q		Т	Е	V	E		K	G)	Q	G	Р		L	G	G	Н	Н		D	F	-	G	G		D	Р	Н	L	Т	G	S	G	D	D	Р	Н
			E	D	E/N	١	М	Q		Q/H		N	Q	H	Ά	R	S		S/'	Y/P				N/	Q	Α	R)	I			S					T/A/N	١	Y	Е		
	79	:76	72	65	55	55	50	45	41	39	33	31	30	24	23	20	18	15	60	202	95	91	85	79	11	75	67	99	0 0	57	56	23	52	48	45	38	26	25	11 4	04	96	93	92
	683	683	683	689	683	683	683	683	683	689	683	683	683	683	683	683	683	683	683	683	682	682	682	682	682	682	682	682		682	682	683	683	682	682	682	683	683	682	682	681	681	681
B95-8	T	A	G T	G		A	C	G	<u>н н</u> Т Т	G	<u> </u>	A	G	i G	A	A	G	<u>с</u>	<u>т</u>	T G	i A	G	C	<u>с</u>	T	AT	C	A	- , G (G G	T	<u>т</u>	<u> </u>			G	<u>т</u>	<u>т (</u>	<u>- </u>	G	<u>с</u>	<u>c</u>	C I
LH/VIH47			-	-	-		-	-		C				-			-	-				-	*	*	*	* *	*	*	* :	* *	*	С	-			-		А	-		-	-	
LH/VIH47										С										с	т											С						A	4				
LH/VIH47										С													*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						A	A C				
LH/VIH47										С													*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						A	A				
LH/VIH47										С													*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						А	С				
LH/VIH47										С													*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						А					
LH/VIH47										С											т											С						A	4				
LH/VIH47										С						G				с	Т											С						A A	A C				
LH/VIH47										С						G				с	т											С						A	4				
LH/VIH47										С						G				с	Т											С						А					
LH/VIH47										С						G							*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						Α					
LH/VIH47																							*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						А					
LH/VIH47																G				С	Т											С						A A	A C				
LH/VIH47																G				с	т											С						A A	A				
LH/VIH47					G					С													*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						Α					
LH/VIH47					G					С						G				С	т											С						A A	4				
LH/VIH47					G															С	Т											С						A A	A				
LH/VIH47					G																		*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						A A	A				
LH/VIH47					G																		*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						А					
LH/VIH47					G											G				С			*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						Α					
LH/VIH47					G											G				С	Т											С						Α					
LH/VIH47					G											G				с	т											С						AA	4				
LH/VIH47					G											G				С	т							G				С						AA	4				
LH/VIH47					G											G							*	*	*	* *	*	*	*	* *	*	С						А					
LH/VIH47					G											G				с	т											С						А	С				
LH/VIH47					G											G				С	Т											С						А	C				

Population contrôle VIH+ : sang total

	314	315	317	318	319		322	320	6	328	330)	331	333	3	34	33	5		338	339	342	34	46	349	3	351	352	355	5	3	356	35	8	359	360	361		366	380
	Α	G	D	G	G		Q	E		Е	K		G	D	(ຊ	(ì		L	М	G	H	H	D		G	Н	G			D	ŀ	ł	L	L	Т		S	V
	S			R	D		E/N/A	D		Q			E/Q	Н	1	R	S/	V		S/T/P					N/A			N/R					F)	R	Р			T/A	
	168381	168376	168370	1683 <i>6</i> 9 1683 <i>6</i> 7	168365	168357	168356 168355	168343	000001	168337	168333	168332	168330 168329	168324	168320	168319	168318 168317	168316	168309	168308 168307	168304	168295	168285	168283	168276 168276	C/ 790T	1682 <i>7</i> 0 1682 <i>6</i> 7	168266	168258	168256	168255	168254	168253 168248		168245	168242	168239	168238	168225	168183
B95-8	G	Α	Т	G A	G	С	A A	G	(G A	А	A	G G	G	Α	G	G	i C	Т	ΤG	G	Α	С	Т	G	A	G C	A	G	т	G	А	T A	۱.	Т	С	С	G	Т	G
VIH2						Α	Т	-					А							С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	Α
VIH3						Α	Т	-							G		А			С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH5	Т					G									G					С		Т						G										A	А	
VIH7	Т					G									G					С		Т						G										A	А	
VIH10									(С																							С						А	
VIH11						Α	Т	- c							G		А		Α	C			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH14						Α	Т	-							G		А			С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH16						G									G					С		Т				С		G										A	Α	
VIH18				С					(С																							С						А	
VIH21						Α	Т	- C							G					С			*	*	*	*	* *	*	*	*									Α	
VIH22					Α										G		1	-		С		Т				С		G											Α	
VIH23						Α	Т	-							G		А			С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH23						G									G		А			С		_	*	*	*	*	* *	*	*	*					_				Α	
VIH23						G									G					C		Т						G							G			A	Α	
VIH23						G	_	_							G					C		Т						G										A	A	
VIH23						A	1								G					C			*	*	<u>^</u>	÷	* *	*	<u>^</u>	Ŷ						-			A	
VIH24						G	-		(L					~					6			*	*	A *	*	A	*	*	*			C			I			A	
VIH28						A		-							6					<u> </u>			*	*	*	*	* *	*	*	*									A	
VIH29						A	וד	-							G					C																			А	
VIH29						A A	י ד	-							G																									
VIH29						A	'								U																								Δ	
VIH29		c				Δ	т	-							G					c			*	*	*	*	* *	*	*	*									^	
VIH29		c				Δ	י ד	-						c	G					c			*	*	*	*	* *	*	*	*									Δ	
VIH29		C				A	י ד	-						C	G					c			*	*	*	*	* *	*	*	*									A	
VIH32						A	T	-							G					C			*	*	*	*	* *	*	*	*									A	
VIH36						Α	Т	-							G		А			C			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH37						G									G					С		Т				С		G										A	А	
VIH38						Α	Г	-							G					С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH38														*	*	*	* *	*	*	* *	*	*	*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH41						Α	Т	-							G					С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH42						G														С		Т						G										A	G	
VIH42						G									G					С		т						G										A	G	
VIH43			Α			G								*	*	*	* *	*	*	* *	*	*	*	*	*	*	* *	*	*	*								A	G	
VIH45						G	С						C A						С	C C		Т					A						(2					А	
VIH47						G									G					С		Т											C						A	
VIH47						Α	Т	-							G					С		т											С						А	
VIH47						А	Т	-							G					С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	
VIH47						G									G					С			*	*	*	*	* *	*	*	*									А	

Population contrôle VIH+ : cellules oropharyngées (1)

	314	315	317	318	319		322	326	328	330	3	331	333	334	t	3	35		33	38	339	342	346	349	#	##	352	355	1	356	3	858	359	360	361	366	380
	Α	G	D	G	G		Q	Е	E	К		G	D	Q		(G		L	-	М	G	н	D		G	Н	G		D		Н	L	L	Т	S	V
	S		E	R	D	E/I	N/G/D	D	Q/D	E/T		Q		R		S/Y	V/E		S/F	:/T	I			N/A/	G	S I	N/R	С		N/G		Р		Р	S	T/A	
	8381	8376	8370	8369 8367	8365	8357	8356 8355	8343	8339 8337	8333	8330	8329	8324	8320	8319	8318	831/	8316	2000 8308	8307	8304	8295	8285 8283	8276 8276	0170	82.67	8266	8258 8256	8255	8254	8253	8248	8245	8242	8239 8238	8225	8183
	16	16	16	16 16	16	16	16 16	16	16 16	16 16	16 16	16	16	16	16	16	10 10	16 16	то 16	16 16	16	16	16 16	16	р ,	16 16	 16	16 16	16	16	16	16	16	16	16 16	16	16
B95-8	G	Α	Т	G A	G	С	A A	G	G A	A A	G	G	G	А	G	G	G	C 1	ГТ	r G	G	Α	СТ	G /	4 (G C	A	GΤ	G	А	Т	A	Т	С	C G	Т	G
VIH3			А			G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *							A	G	
VIH3			А			G											(G					* *	* :	*	* *	*	* *							A	A	
VIH3						А	Т							G			A (G	C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								A	
VIH3																	. (G		_			* *	* :	*	* *	*	* *									
VIH3														G			A (G	C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								A	
VIH3						G								G			A (G	C	2			* *	* :	*	* *	*	* *									
VIH3	Т					G								G					0	2			* *	* :	*	* *	*	* *								A	
VIH5						G				C										С		Т					G								A	A	
VIH5						G				C												Т					G								A	A	
VIH6			А			G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *							A	G	
VIH6			A			G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *									
VIH7			А			G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *							A	G	
VIH7						А	Т																														
VIH7						G								G					C	2		Т					G								A		
VIH7						G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *							A	G	
VIH9			Α			G																													A	G	
VIH10									С																						С					A	
VIH11						Α	Т	С								A		4	4 C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								A	
VIH13						G								G					0	2		Т		(Ĵ		G								A	A	
VIH14														G		A			C	2			* *	* :	*	* *	*	* *									
VIH14						Α	Т							G		A			C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								Α	
VIH16			Α			G							*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *							A	G	
VIH16	Т					G								G					0	2		Т					G								A	A	
VIH17											C	A							0	2		Т				A						С					
VIH18				С					С								(G													С					Α	
VIH19						G								G					C	2		Т				A	G								A	Α	
VIH20						G								G	Т				0	2		Т		(Ĵ		G								A	A	
VIH21						Α	Т	С						G					C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								Α	
VIH22					Α	G								G			Т		C	2		Т		(<u>3</u>		G								A	Α	
VIH23						А	т							G		A			C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								А	
VIH23						Α	Т						*	*	*	*	*	* *	* *	* *	*	*	* *	* :	*	* *	*	* *								Α	
VIH24									С															А		А					С			Т		Α	
VIH25														G					C	2			* *	* :	*	* *	*	* *								Α	
VIH25									С														С								С					Α	

Population contrôle VIH+ : cellules oropharyngées (2)

	314	315	317	318	319	32	2	326	328	330	331	333	334		335	;	3	38	339	342	34	6	349	##	3	52	355		356	3!	58 3	359	360	361	366	380
	Α	G	D	G	G	Q		E	E	К	G	D	Q		G			L	М	G	н		D	G	1	H	G	1	D		-	L	L	т	S	V
	S		Е	R	D	E/N/0	G/D	D	Q/D	E/T	Q		R		S/V/	E	S/	F/T	Т				N/A/G	S	N	/R	С		N/G	F	,		Р	S	T/A	
																												<u> </u>								
	с	9	0	6 N	Ь	~ 9	, ц	ŝ	6 N	м с	0 0	4	0	מת	2	9	6	× ~	4	Б	Б	ŝ	പ	0	~	9	<u>ه</u> ۵	Ь	4		0	ы	2	റെ	Ь	ŝ
	338	337	337	36	336	335	335	334	333	333	333 32	332,	332	212	31.	331	330	300	330	329	328	328	327	327	326	326	325	325	325	325	7	324	324	323	322	318
	168	168	168	168 168	168	168 168	168	168	168 168	168 168	168 168	168	168	162	162	168	168	168 168	168	168	168	168	168 168	168	168	168	168 168	168	168	168	Γ Γ	168	168	168 168	168	168
B95-8	G	Α	Т	G A	G	C A	A	G	G A	A A	G G	G	А	G	G	С	Т	T G	G	Α	С	Т	G A	G	С	А	G T	G	А	т /	1	Т	С	C G	Т	G
VIH26	Т					А	Т			G		*	*	* *	* *	*	*	* *	*	*	*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH26	Т					Α	Т			G			G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH27									С																				G	С				Т	Α	
VIH27									С																				G					т	G	
VIH28						А	Т		С				G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH28						А	Т						G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH28									С									С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH28									С				G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH28													G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH29													G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH29						А	Т						G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH30						G							G					С		Т						G								Α	Α	
VIH32				C			Т						G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH33			Α			G						*	*	* *	* *	*	*	* *	*	*	*	*	* *	*	*	*	* *							А	G	
VIH33						G						*	*	* *	* *	*	*	* *	*	*	*	*	* *	*	*	*	* *							А	G	
VIH33	Т		Α			G							G					С		Т						G								Α	Α	
VIH35					Α	G G							G					С		Т						G								А	Α	
VIH36						G	С						G					С	Α	Т						G		Α						Α	Α	
VIH37						G							G					С		Т			C			G								А	Α	
VIH38						А	Т						G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH41						А	Т						G					С			*	*	* *	*	*	*	* *								Α	
VIH42						G							G					С		Т						G								A	G	
VIH43						G			С				G					С		Т						G	Т							A	G	
VIH46									С																					С						
VIH47									С																					С					А	
VIH47						G							G					С		т										С					А	

Population contrôle LH :

321	322	328	334	338	342	346	348	352	355	356	361	366	375	376	381
Р	Q	Е	Q	L	G	Н	Н	Н	G	D	Т	S	D	Р	Q
L	N/A	Q	R	S			Ν	R		G	S	Т	G		К

		168359	168357	168355	168339	168320	168308	168295	168285	168279	168266	168256	168254	168253	168239	168238	168225	168197	168193	168180
C .	B95-8	С	С	А	G	А	Т	А	С	С	А	Т	А	Т	С	G	Т	А	С	С
Sang total	LH2		А	Т		G	С		*	*	*	*					А	G		
			А	Т		G	С		*	*	*	*								
					С									С			А			
																			А	
																				А
	LH6					G	С		*	*	*	*					А			
			А	Т		G	С		*	*	*	*					А	G		
	LH11	Т				G	С	Т		А	G					А	А			
	LH2				С								G	С	Т		А			
Cellules	LH7				С									С			А			
	LH9				С									С			А			
oropharyngées	LH10		А	Т		G	С		*	*	*	*					А			
	LH11		G	С		G	С		*	*	*	*				A	А			

G

A A

A A

G C

G C

LH14

G C

G C T

Rôle des variants de la protéine de latence LMP1 du virus d'Epstein Barr dans le développement du lymphome de Hodgkin chez les personnes VIH+

Mots clés : EBV, LMP1, Lymphome de Hodgkin, VIH, NGS, cytokines, cycle cellulaire

<u>Résumé</u> : L'objectif de notre travail est de mieux comprendre le rôle de LMP1 et de ses variants délétés de 30 ou 69pb en C-terminal dans le développement du lymphome de Hodgkin (LH) chez les patients VIH+. Le séquençage de LMP1 dans des échantillons de sang total et de cellules oropharyngées de patients de la cohorte Lymphovir (LH/VIH+) et de deux populations contrôles (VIH+ et LH) a permis d'étudier la fréquence des variants de LMP1 *in vivo*. Ce travail a révélé que le variant LMP1-del30 semble plus fréquent chez les patients avec une immunosuppression modérée, durant laquelle l'incidence des LH est élevée. Par ailleurs, nous avons établi un modèle cellulaire dérivé de LH, exprimant LMP1 de façon inductible, montrant des différences d'expression des cytokines et de progression du cycle cellulaire en fonction des variants de LMP1. Notre travail supporte l'hypothèse d'une plus grande oncogénicité du variant LMP1-del30 et suggère qu'il pourrait être un facteur de risque de développer un LH.

Implication of Epstein-Barr virus latency membrane protein 1 and its variants in the development of Hodgkin's lymphoma among HIV+ people

Key words: EBV, LMP1, Hodgkin's lymphoma, HIV, NGS, cytokines, cell cycle

<u>Abstract</u>: The aim of this work was to improve our understanding of the role of LMP1 and its 30bp and 69bp deletion variants in the development of Hodgkin's lymphoma (HL) among HIV+ people. Blood and saliva samples were collected from HL/HIV+ patients recruited in the Lymphovir cohort, as well as in two control populations (HIV+ and HL). Next-Generation Sequencing allowed us to determine the frequency of LMP1 variants in these samples. This work showed that the del30-LMP1 variant seems to be more frequent in patients with a moderate immunosuppression, associated with a higher HL incidence. Besides, we established three HL-derived cell lines expressing WT-LMP1 or its variants and showed differences of cytokine expression and progression of the cell cycle depending on the variant. Our work supports the hypothesis of a greater oncogenicity of del30-LMP1 variant and suggests that it could be a risk factor for the development of HL.