



**HAL**  
open science

# Inflammations orales et infection par le virus d'Epstein-Barr : vers un nouveau paradigme en pathogénèse orale

Charles-Vivien Olivieri

► **To cite this version:**

Charles-Vivien Olivieri. Inflammations orales et infection par le virus d'Epstein-Barr : vers un nouveau paradigme en pathogénèse orale. Immunologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2018. Français. NNT : 2018AZUR4201 . tel-02103145

**HAL Id: tel-02103145**

**<https://theses.hal.science/tel-02103145v1>**

Submitted on 18 Apr 2019

**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.

# THÈSE DE DOCTORAT

## Inflammations orales et infection par le virus d'Epstein-Barr :

vers un nouveau paradigme en pathogenèse orale

**Charles-Vivien OLIVIERI**

Laboratoire Microbiologie Orale, Immunité et Santé (MICORALIS)

**Présentée en vue de l'obtention du grade de  
docteur en Immunologie et Microbiologie**

d'Université Côte d'Azur

**Dirigée par :** Alain Doglio

**Soutenue le :** 6 Décembre 2018

**Devant le jury, composé de :**

Alain Doglio, MCU-PH, Université Côte d'Azur

Henri Gruffat, CR1, Université de Lyon

Laurence Lupi, PU-PH, Université Côte d'Azur

Jacques-Olivier Pers, PU-PH, Université de  
Bretagne Occidentale

# Inflammations orales et infection par le virus d'Epstein-Barr :

vers un nouveau paradigme en pathogénèse orale

Jury :

**Président du jury**

Laurence Lupi, PU-PH, Université Côte d'Azur

Directeur de thèse

Alain Doglio, MCU-PH, Université Côte d'Azur

Rapporteurs

Henri Gruffat, CR1, Université de Lyon

Jacques-Olivier Pers, PU-PH, Université de Bretagne Occidentale

## RESUME

La cavité buccale constitue une porte d'entrée et un site réservoir majeur pour une diversité de virus. Mis à part l'herpèsvirus simplex, peu d'études virologiques détaillent le rôle des virus pathogènes de la sphère orale dont le virus d'Epstein-Barr. Le consensus est que les inflammations orales surviennent principalement en réaction à des infections bactériennes et fongiques provoquant une dysbiose du biofilm oral. Toutefois, ce modèle n'est pas parfait et il explique mal les récurrences observées après décontamination, le découplage entre dysbiose et poussées inflammatoires, la proximité de dents atteintes et saines dans un environnement bactérien similaire. L'hypothèse d'un mécanisme synergique combinant virus et bactéries a été proposée pour la parodontite. Selon ce modèle, l'action complémentaire des deux types d'agents infectieux sur le microenvironnement immunitaire favoriserait la chronicité inflammatoire et l'évolution de la maladie. Nos travaux se concentrent sur l'étude de l'infection de la cavité orale par EBV. EBV est un virus ubiquitaire infectant l'homme de manière persistante. La cavité orale est le site privilégié pour sa réplication avec une production salivaire quasi-constante. Outre un rôle transformant majeur, l'implication de EBV est aussi suspectée pour plusieurs maladies inflammatoires.

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés au lichen plan oral (LPO), une maladie auto-immune dont l'étiopathogénie n'est pas clairement établie. Sur des biopsies de patients atteints de LPO (n=99), nous avons démontré par hybridation in situ que le LPO est fréquemment infecté par EBV (74%), notamment les formes cliniques érosives. Nous montrons que le degré d'infiltration des lésions par des cellules infectées par EBV (EBV+) est corrélé avec les paramètres inflammatoires et que les cellules EBV+ infiltrées sont des plasmocytes. Cela apporte un élément nouveau dans la mesure où les plasmocytes sont reconnus comme des cellules immunitaires régulatrices majeures. Nous décrivons des profils cytokiniques différents entre LPO infectés ou non, sans qu'il soit possible à ce stade de pouvoir impliquer directement les plasmocytes. Nous confirmons par microscopie électronique que les plasmocytes hébergent les stades tardifs du cycle d'EBV et produisent des virions dans le LPO, suggérant un mécanisme d'amplification locale de l'infection. Ensuite, nous nous sommes intéressés à la parodontite, maladie inflammatoire chronique commune qui détruit la structure parodontale et provoque le déchaussement dentaire. Cette maladie est clairement identifiée comme facteur aggravant de nombreuses maladies systémiques. Nos études avaient déjà mis en évidence un lien direct entre infection EBV et la sévérité de la parodontite. Mes travaux ont permis de montrer que le parodonte inflammatoire est infiltré par des cellules EBV+ qui semblent être majoritairement des plasmocytes. La présence de plasmocytes producteurs de virus au sein de la lésion inflammatoire pourrait expliquer l'infection des épithéliums adjacents. De plus, une étude clinique menée sur une petite cohorte de patients traités pour parodontite met en évidence une corrélation entre la diminution de la charge EBV salivaire et l'amélioration clinique de patients après traitement. Si ce résultat se confirme, il constituerait un argument supplémentaire en faveur d'une contribution de l'infection parodontale par EBV à la globalité de la charge EBV salivaire. En conclusion, nos données mettent en évidence la présence quasi constante d'EBV dans deux types de lésions orales inflammatoires. Cette infection virale contribue à aggraver une situation inflammatoire locale associée ou pas à une dysbiose bactérienne. L'observation majeure concerne la présence, souvent massive, de plasmocytes infectés dont le rôle reste à identifier. Ces observations constituent des avancées significatives qui permettent d'étayer un nouveau modèle de pathogénie orale associant virus et bactéries.

Mots-clés : virus d'Epstein-Barr, lichen plan oral, parodontite, plasmocytes.

## ABSTRACT

The oral cavity is a major entry point and reservoir site for a variety of viruses. Apart from herpesvirus simplex, few virological studies detail the role of oral pathogenic viruses, including Epstein-Barr virus. The consensus is that oral inflammation occurs mainly in response to bacterial and fungal infections causing dysbiosis of the oral biofilm. However, this model is not perfect and does not explain well the recurrences observed after decontamination, the decoupling between dysbiosis and inflammatory outbreaks, the proximity of affected and healthy teeth in a similar bacterial environment. The hypothesis of a synergistic mechanism combining viruses and bacteria has been proposed for periodontitis. According to this model, the complementary action of two types of infectious agents on the immune microenvironment would promote inflammatory chronicity and disease progression. Our work focuses on the study of oral cavity infection with EBV. EBV is a ubiquitous virus that persistently infects humans. The oral cavity is the preferred site for its replication with almost constant saliva production. In addition to a major transformative role, EBV's involvement is also suspected for several inflammatory diseases.

First, we focused on oral lichen planus (OPL), an autoimmune disease whose etiopathogeny is not clearly established. On biopsies of patients with OPL (n=99), we demonstrated by in situ hybridization that OPL is frequently infected with EBV (74%), particularly in erosive clinical forms. We show that the degree of infiltration of lesions by EBV-infected cells (EBV+) is correlated with inflammatory parameters and that the infiltrated EBV+ cells are plasma cells. This brings a new element to the extent that plasma cells are recognized as major regulatory immune cells. We describe different cytokinic profiles between infected and uninfected OPL, although it is not possible at this stage to directly involve plasma cells. We confirm by electron microscopy that plasma cells host the late stages of the EBV cycle and produce virions in the OPL, suggesting a local amplification mechanism of infection. Then, we focused on periodontitis, a common chronic inflammatory disease that destroys the periodontal structure and causes tooth loosening. This disease is clearly identified as an aggravating factor in many systemic diseases. Our studies had already shown a direct link between EBV infection and the severity of periodontitis. My work has shown that the inflammatory periodontium is infiltrated by EBV+ cells, which appear to be predominantly plasma cells. The presence of virus-producing plasma cells within the inflammatory lesion may explain the infection of adjacent epithelia. In addition, a clinical study conducted on a small cohort of patients treated for periodontitis showed a correlation between the decrease in salivary EBV load and the clinical improvement of patients after treatment. If this result is confirmed, it would be an additional argument in favour of a contribution of periodontal EBV infection to the overall salivary EBV burden. In conclusion, our data show the almost constant presence of EBV in two types of inflammatory oral lesions. This viral infection contributes to worsening a local inflammatory situation associated or not with bacterial dysbiosis. The main observation concerns the presence, often massive, of infected plasma cells whose role remains to be identified. These observations represent significant advances that support a new model of oral pathogenesis combining viruses and bacteria.

Keywords : Epstein-Barr virus, oral lichen planus, periodontitis, plasma cell.

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier très sincèrement les membres du jury de thèse, Madame la Présidente du jury, Professeur Laurence Lupi, Doyen de l'UFR Odontologie, Messieurs les rapporteurs, le Professeur Jacques Olivier Pers et le Docteur Henri Gruffat, qui se sont déplacés de leurs universités respectives Brest et Lyon.

Je suis honoré de votre présence et de votre intérêt pour mon travail.

À mon Directeur de thèse et Directeur de MICORALIS, Monsieur le Docteur Alain DOGLIO, un immense merci pour votre confiance, votre accompagnement tout au long du parcours, votre aide précieuse, vos conseils avisés, votre disponibilité et votre indulgence, je vous assure de mon immense gratitude.

J'exprime mon immense gratitude pour la Conseil Régional SUD PACA et l'entreprise TxCell sans qui le financement de mon Emplois Jeunes Doctorants 2015/2018 n'aurait pu être possible.

Je tiens à remercier chaleureusement le Docteur Séverine Vincent-Bugnas qui a énormément contribué au projet Parodontite en assurant l'essentiel de la partie clinique et la récupération des prélèvements mais aussi de l'embauche d'étudiants en dentaire très motivés, ses « petites mains » supplémentaires ont été d'une aide précieuse, et au travers de financements salvateurs.

Je voudrais faire également une mention spéciale au Docteur Hélène Raybaud pour son immense implication dans le projet Lichen, la collection des 99 lichens a été une base de travail formidable.

Aux Docteurs Vincent-Bugnas et Raybaud s'ajoutent le Docteur Marlène Chevalier et le Professeur Robert Marsault, membres de l'équipe MICORALIS, votre expertise et vos compétences ont été prépondérantes pour mes travaux.

Je remercie vivement le personnel de l'UFR Odontologie et les autres membres de MICORALIS que j'ai eu le plaisir de côtoyer pendant ces trois belles années de doctorat.

Madame le Docteur Flavia Spirito, Monsieur le Docteur Sylvain Olivero, Madame Laurence Fantin, un grand merci pour votre amitié, votre aide, votre convivialité lors des bons moments partagés depuis mon arrivée à l'UTCG.

Je tiens aussi à remercier tous les directeurs qui m'ont accueilli avec bienveillance dans leurs laboratoires lors de mes divers stages universitaires : Madame le Docteur Geneviève Rougon, Messieurs les Docteurs Franck Debarbieux, Thierry Pourcher, Thierry Virolle ainsi que leurs équipes.

Votre expertise, votre rigueur, votre dynamisme et vos conseils m'ont permis d'acquérir une formation scientifique et technique.

Un merci tout particulier au Docteur Sabine Lindenthal qui m'a toujours soutenu et encouragé dans mes moments de doutes.

À mes parents, un énorme merci du fond du cœur, pour leur soutien sans faille, leur dévouement, leurs encouragements, leurs sacrifices et leur patience sans limite.

# TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS .....	9
LISTE DES FIGURES .....	12
AVANT-PROPOS.....	13
INTRODUCTION.....	15
PARTIE 1 : LE VIRUS EPSTEIN-BARR.....	15
I. Découverte du virus Epstein-Barr.....	15
II. Épidémiologie .....	15
III. Classification virologique.....	16
IV. Organisation, génome et structure.....	17
V. Infection par EBV : aspects cellulaires.....	18
1. Mécanismes d'infection du lymphocyte B par EBV.....	19
2. Mécanismes d'infection des cellules épithéliales par EBV.....	19
VI. Cycle biologique d'EBV.....	21
1. Infection primaire.....	21
2. Mise en place d'une infection latente persistante.....	23
3. Activation du lymphocyte B infecté et basculement vers la phase lytique.....	25
VII. Phase de latence d'EBV et rôles des protéines de latence.....	28
1. Description de la phase de latence .....	28
1. Rôles des protéines associées à la phase de latence .....	29
a. La protéine EBNA-1.....	29
b. Les protéines EBNA-2, -3 et -LP .....	30
c. La protéine membranaire latente 1 (LMP1).....	30
d. Les protéines LMP2A et 2B.....	31
e. EBER.....	31
VIII. Les pathologies associées à EBV.....	32
1. La mononucléose infectieuse (MNI).....	32
2. Cancers associés à EBV .....	33
3. La leucoplasie orale chevelue .....	34
4. Les maladies auto-immunes .....	35
a. EBV et sclérose en plaques .....	36
b. EBV et lupus érythémateux disséminé.....	40
c. EBV et polyarthrite rhumatoïde .....	42
d. EBV et syndrome de Sjögren .....	45

PARTIE 2 : LE LICHEN PLAN ORAL.....	50
I. <i>Historique</i> .....	50
II. <i>Épidémiologie</i> .....	50
III. <i>Localisation</i> .....	51
IV. <i>Caractéristiques cliniques</i> .....	51
1. La phase initiale .....	52
2. La phase d'état .....	52
3. La phase tardive .....	53
4. La transformation maligne .....	54
V. <i>Les maladies systémiques associées</i> .....	55
VI. <i>Traitement du LPO</i> .....	55
VII. <i>Caractéristiques histologiques</i> .....	55
1. Rappels sur la structure histologique de la muqueuse buccale .....	55
2. Critères histologiques du lichen plan oral .....	56
VIII. <i>Diagnostic du lichen plan oral</i> .....	57
IX. <i>Étiopathogénie</i> .....	57
1. Les facteurs génétiques .....	57
2. Les agents infectieux viraux.....	58
a. Le virus de l'hépatite C .....	58
b. Les papillomavirus humains.....	58
c. Le virus d'Epstein-Barr .....	59
X. <i>Mécanismes physiopathologiques</i> .....	60
1. Lyse des kératinocytes basaux par les lymphocytes T .....	60
2. Mécanismes non spécifiques .....	62
a. Destruction de la membrane basale.....	62
b. Les métalloprotéases matricielles.....	62
c. Les mastocytes.....	62
d. Les chimiokines.....	62
e. L'immunité humorale.....	62
PARTIE 3 : LA PARODONTITE .....	63
I. <i>Les maladies parodontales : définition et généralités</i> .....	63
II. <i>Prévalence des parodontites</i> .....	64
III. <i>Éléments diagnostics des maladies parodontales</i> .....	65
IV. <i>Anatomo-pathologie des maladies parodontales</i> .....	66
V. <i>Maladies parodontales et santé</i> .....	69
1. Conséquences du déchaussement dentaire.....	69

2. Conséquences des parodontites sur la santé générale .....	70
VI. <i>Traitement actuel des parodontites</i> .....	72
VII. <i>Étiopathogénie des parodontites</i> .....	73
1. Dysbiose bactérienne et parodontite .....	73
2. Virulence bactérienne et inflammation .....	76
VIII. <i>La réponse inflammatoire</i> .....	77
1. Aspects généraux .....	77
2. Implication des lymphocytes B et des plasmocytes dans la parodontite .....	80
IX. <i>Hypothèse d'une synergie viro-bactérienne à l'origine des parodontites : vers un nouveau paradigme en parodontologie</i> .....	83
1. Historique .....	83
2. Limite d'un modèle étiologique uniquement bactérien .....	85
3. EBV et parodontite .....	87
a. État de la littérature .....	87
b. La synergie viro-bactérienne .....	89
RESULTATS .....	92
PARTIE 1 : ÉTUDE DU VIRUS EPSTEIN-BARR DANS LE LICHEN PLAN ORAL .....	92
I. <i>Présentation de l'article « Epstein-Barr Virus-Infected Plasma Cells Infiltrate Erosive Oral Lichen Planus »</i> .....	92
II. <i>Présence de lymphocytes T spécifiques des antigènes EBV dans le LPO</i> .....	100
PARTIE 2 : ÉTUDE DU VIRUS EPSTEIN-BARR DANS LA PARODONTITE CHRONIQUE .....	102
I. <i>Résultats antérieurs</i> .....	102
II. <i>Analyse de l'infiltrat inflammatoire dans la gencive avec parodontite</i> .....	105
III. <i>Effet du traitement conventionnel de la parodontite sur la charge EBV salivaire</i> .....	110
DISCUSSION ET PERSPECTIVES .....	114
PARTIE 1 : RELATION ENTRE LE LICHEN PLAN ORAL, EBV ET LES PLASMOCYTES .....	114
I. <i>Comment sont produits les plasmocytes EBV+ dans le LPO ?</i> .....	115
II. <i>EBV, plasmocytes et autoanticorps dans le LPO</i> .....	116
III. <i>EBV, plasmocytes et cytokines dans le LPO</i> .....	116
PARTIE 2 : RELATION ENTRE LA PARODONTITE CHRONIQUE, EBV ET LES PLASMOCYTES .....	119
PARTIE 3 : CONCLUSION ET PROPOSITION D'UN MODELE DE TRAVAIL : « THE EBV MODEL » .....	120
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	123

## LISTE DES ABREVIATIONS

<i>Aa</i>	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
AAN	Anticorps anti-nucléaire
ACPA	Anticorps anti-protéines/peptides citrullinés
ACR	American College of Rheumatology
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNdb	AND double brin
AGE	Advanced glycation end products
AhR	Aryl hydrocarbon Receptor/ Récepteur d'hydrocarbures arylique
APP	Peptide A-Bêta
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN messenger
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BCR	B-cell Receptor
BDF1	Protéine de capsid triplex 2
BFRF3	Petite protéine de capsid
BL	Lymphome de Burkitt
BLIMP-1	B lymphocyte-induced maturation protein-1
BOP	Bleeding On Probing/ Saignement gingival au sondage
BORF1	Protéine de capsid triplex 1
BPCO	Bronchopneumopathie chronique
BVRF2	Assemblé
CAL	Clinical Attachment Level / Niveau d'attache clinique
CD	Cluster de différenciation
CE	Cellules épithéliales
CEpal	Cellules épithéliales du palais
CEpp	Cellules épithéliales de la poche parodontale
CG	Centre germinatif
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
COX	Cyclo-oxygénases
CP	Parodontite chronique
Cp	Promoteur Cp de l'EBV
<i>Cr</i>	Campylobacter rectus
CT	Tissu conjonctif
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EA (-D / -R)	Early Antigen (-diffuse / -restricted)
EBER	Epstein-Barr Encoded Small RNA
EBER-HIS	Détection par HIS des EBER
EBF1	Early-B-Cell Factor 1
EBNA	Epstein-Barr Nuclear Antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
<i>Ec</i>	Eikenella corrodens
EJ	Épithélium jonctionnel
ELAM	Leucocyte endothelial adhesion molécule
ENKTL	Lymphome extra-nodal NK/T
EphA2	Protéine Ephrin A2

EphrinA1	Ligand soluble de l'EphA2
ES	Épithélium sulculaire
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FR	Facteur rhumatoïde
GE	Épithélium gingival
gp	glycoprotéine
HCV	Virus Hépatite C Humain
HIS	Hybridation in situ
HL	Lymphome de Hodgkin
HLA	Human Leucocyte Antigen
HPV	Papillomavirus humain
HSV	Virus herpès simplex
HTLV	Human T-Lymphotropic Virus
ICAM	Intercellular adhesion molecule
IE	Immediate Early
IF	Immunofluorescence
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IR	Internal Repeat
ITAM	Immunorecepteur Tyrosine-based Activation Motif
kb	kilobase
kDA	kilodalton
LB	Lymphocytes B
LCG	Liquide crévulaire gingival
LCL	Lignées Cellulaires Lymphoblastoïdes
LCMV	virus de la chorioméningite lymphocytaire
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LCV	Lymphocryptovirus
LED	Lupus érythémateux disséminé
LMP	Latent Membrane Protein
LNH	Lymphome non-hodgkinien
LPO	Lichen Plan Oral
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocytes T
MBP	Protéine de base de la myéline
MMP	Métalloprotéinase matricielle
MNI	Mononucléose Infectieuse
NET	Pièges extracellulaires des neutrophiles
NL	Néphropathie lupique
NPC	Carcinome du nasopharynx
NRP1	Neuropiline 1
Oct-2	Octamer-binding-protein-2
OHRQL	Oral Health Related Quality of Life
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OPG	Ostéoprotégérine
PAD	peptidyl-arginine-désiminase
pal	palais
Pax5	Paired Box 5

pb	paire de bases
PC	Plasmocytes
<i>Pg</i>	Porphyromonas gingivalis
PGE2	Prostaglandine E2
PI	Indice de plaque
<i>Pi</i>	Prevotella intermedia
PMN	Polymorphonucléaires
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PP	Poche parodontale
PPS/ PPD	Profondeur de poche au sondage / Periodontal pocket deep
PR	Polyarthrite rhumatoïde
Qp	Promoteur Qp de l'EBV
RANA	Antigène nucléaire de la polyarthrite rhumatoïde
RANKL	Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire KAPPA B
RANTES	Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted
SEP	Sclérose en plaques
SLE	Structures lymphoïdes ectopiques
SLPT	Syndrome lympho-prolifératif post transplantation
SNC	Système nerveux central
SNP	Single nucleotide polymorphism
SS	Syndrome de Sjögren (pSS primaire / sSS secondaire)
Td	Treponema denticola
TF	Tannerella forsythia
TIMP	Tissue Inhibitor of Metalloproteinase
TLR	Toll-Like Reception
TNF	Tumor Necrosis Factor
TR	Terminal repeat
TR	Terminal Repeat
UL	Long Unique region
UL	Long Unique Region
US	Short Unique region
US	Short Unique Region
VCA	Viral Capside Antigen
VCP1	Viral citrullinated peptide
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
Wp	Promoteur Wp de l'EBV
XBP-1	X-box Binding Protein-1

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Structure du virus Epstein-Barr et représentation schématique de son génome <sup>43,44</sup> .....	18
Figure 2 : Principaux évènements associés à l'infection EBV <sup>80</sup> .....	22
Figure 3 : Le modèle du centre germinatif et de la persistance EBV <sup>86</sup> .....	24
Figure 4 : Cycle biologique biphasique d'EBV <sup>88</sup> .....	25
Figure 5 : Induction de la réactivation d'EBV lors de la différenciation plasmocytaire <sup>98</sup> .....	28
Figure 6: Caractéristiques cliniques des LPO <sup>353</sup> .....	52
Figure 7 : Caractéristiques histo-pathologiques de la forme réticulaire d'OLP <sup>353</sup> .....	57
Figure 8 : Hypothèse pour l'immunopathogenèse du LPO <sup>355,386</sup> .....	61
Figure 9 : Schéma d'une dent, de son parodonte et des principaux indices cliniques.....	65
Figure 10 : Évaluation de l'indice de plaque.....	66
Figure 11 : Évaluation du saignement gingival au sondage.....	66
Figure 12 : Développement histo-pathologiques des lésions parodontales <sup>460,461</sup> .....	69
Figure 13 : Les complexes microbiens <sup>502</sup> .....	75
Figure 14 : La réponse innée suite à une agression bactérienne du parodonte <sup>519</sup> .....	79
Figure 15 : La réponse acquise en réponse à une agression bactérienne du parodonte <sup>519</sup> .....	80
Figure 16 : Concepts de l'étiopathogénie des maladies parodontales <sup>461,556</sup> .....	84
Figure 17 : Concept actuel de l'étiopathogénie des maladies parodontales <sup>461</sup> .....	85
Figure 18 : Nouveau modèle de développement de la parodontite <sup>567</sup> .....	91
Figure 19 : Réactivité anti-EBV des LT CD8+ de l'infiltrat inflammatoire d'un LPO.....	101
Figure 20 : Quantification de l'expression de transcrits EBV dans le matériel parodontal <sup>13</sup> .....	103
Figure 21 : Infection par l'EBV et sévérité de la parodontite chronique <sup>13</sup> .....	104
Figure 22 : Types cellulaires infectés par EBV dans la gencive atteinte de CP.....	105
Figure 23 : Fréquences des populations cellulaires et profondeur de la poche parodontale.....	107
Figure 24 : PrimeFlow™ RNA Assay.....	109
Figure 25 : Évolutions de la charge EBV après le traitement conventionnel.....	112
Figure 26 : Modèle EBV.....	121

## AVANT-PROPOS

Au cours de mon contrat d'ingénieur hospitalier au sein de l'Unité de Thérapie Cellulaire et Génique du CHU de Nice et par son étroite collaboration avec le laboratoire MICORALIS, j'ai découvert avec curiosité le vaste domaine de l'odontologie et son importance en matière de santé publique. Aussi, c'est avec détermination que j'ai souhaité participer, grâce à ma bourse de thèse, à la recherche en odontologie.

En particulier, il m'est apparu que les mécanismes physiopathologiques responsables des maladies orales les plus fréquentes, comme les parodontites par exemple, étaient encore assez mal compris et que nous étions encore très démunis au niveau thérapeutique pour traiter ces maladies.

Les affections bucco-dentaires sont extrêmement fréquentes et impactent directement l'état général et la qualité de vie des patients. Au-delà des conséquences les plus visibles d'une mauvaise hygiène bucco-dentaire (douleurs, troubles de la mastication, perte de dents, halitose estime de soi ...), les pathologies orales (gingivites, parodontites, caries, candidoses, lichens plan oraux ...) sont de plus en plus identifiées comme des cofacteurs qui aggravent de nombreuses pathologies systémiques. Ainsi, les parodontites sont très clairement associées aux maladies cardiovasculaires, pulmonaires, auto-immunes, au diabète, aux cancers mais également à la grossesse<sup>1-4</sup>.

Une bonne santé orale repose principalement sur l'équilibre symbiotique qui permet la coexistence ordonnée de la multiplicité des espèces qui composent la flore microbienne orale. Essentiellement, des bactéries et des champignons qui se multiplient sur les muqueuses orales sous la forme d'un biofilm organisé qui peut être très spécifique d'un site et d'un individu<sup>5</sup>.

Cet équilibre symbiotique concerne également l'hôte dans la mesure où les interactions entre l'hôte et le microbiote oral sont multiples et contribuent naturellement à la bonne santé orale, tout particulièrement concernant l'immunité orale. Les causes du basculement d'une situation saine à une situation pathologique sont multiples et restent la plupart du temps assez difficiles à établir.

Cependant, la situation pathologique met souvent en évidence une multiplication et une évolution de la composition de la flore microbienne avec l'émergence d'espèces pathogènes qui provoque l'exacerbation des réactions inflammatoires. Lorsque cette dysbiose perdure, les processus inflammatoires peuvent conduire à l'altération des structures orales comme la destruction des tissus de soutien de la dent dans le cas des parodontites.

En parallèle, cette situation inflammatoire favorise la libération systémique de substances pro- ou anti-inflammatoires comme les cytokines et les chimiokines pouvant induire, localement, mais également à distance dans l'organisme de nouveaux processus inflammatoires.

De même, l'émergence d'une flore pathogène orale présente le risque de la dissémination de ces bactéries vers d'autres sites de l'organisme avec l'induction de nouvelles réactions inflammatoires<sup>6-8</sup>.

Dans ce contexte, le laboratoire MICORALIS se positionne comme un acteur de la recherche en odontologie spécialisé dans les interactions entre le microbiote oral, l'immunité et les pathologies orales. Bien que le consensus général en pathologie infectieuse orale considère que l'émergence d'espèces bactériennes ou fongiques pathogènes soit responsable du déclenchement des processus inflammatoires, il s'avère que la plupart des lésions orales (dont les parodontites) sont également infectées par des virus.

Les sites oraux sont en effet des portes d'entrée et des réservoirs facilitant la persistance et la dissémination dans l'organisme pour de nombreux virus. Parmi les nombreuses variétés de virus détectés dans la bouche, les plus nombreux sont les bactériophages<sup>9</sup>, de nombreux virus à ARN sont aussi détectés (entérovirus, rougeole, oreillons, ...), des rétrovirus (VIH, HTLV).

Toutefois les infections persistantes par des virus à ADN des familles *Herpesviridae* ou papillomaviridae sont les plus fréquentes. Dès 1992, les travaux de notre laboratoire ont mis en évidence la présence des génomes viraux (EBV et HPV) dans les gencives de patients affectés de parodontites<sup>10,11</sup>. Il est clair que la fréquence des infections orales à herpèsvirus (principalement EBV et CMV) pose la question de leur contribution à la pathologie. Dès 2007, Jorgen SLOTS a émis l'hypothèse de l'existence d'un mécanisme synergique associant virus et bactéries qui en agissant localement sur le microenvironnement immunitaire pourrait accélérer l'évolution des parodontites<sup>12</sup>.

Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressé à l'étude des virus en pathogenèse orale, une thématique émergente qui reste encore assez peu étudiée et qui ouvre des champs d'investigation innovants. Dans ce contexte, basé sur les résultats de l'équipe qui mettaient en évidence par hybridation in situ (EBER-ISH) une répllication d'EBV intense au cours des parodontites<sup>13</sup>, j'ai donc souhaité poursuivre les investigations sur la présence d'EBV dans la parodontite chronique (CP) et étudier l'implication d'EBV dans une autre pathologie orale induisant aussi des lésions inflammatoire, le lichen plan oral (LPO).

Dans ce mémoire, l'introduction contient essentiellement des généralités bibliographiques relatives au virus Epstein-Barr et à sa biologie, ainsi qu'un état des lieux concernant l'implication de ce virus dans diverses pathologies inflammatoires dont les deux pathologies orales (LPO et CP) étudiées au cours de ma thèse.

Les résultats de mon travail doctoral sont présentés dans l'article (cf. Résultats, Partie 1, I.) suivi de la présentation de résultats non-encore publiés présentés encore sous leur forme expérimentale.

# INTRODUCTION

## Partie 1 : Le virus Epstein-Barr

### I. Découverte du virus Epstein-Barr

En 1950, Denis Burkitt, chirurgien britannique travaillant en Afrique équatoriale, décrit des cas de lymphomes chez les enfants et remarque qu'ils sont plus fréquents dans les régions où sévit le paludisme. Il propose une étiologie infectieuse (et même virale) à ces lymphomes. Au début des années 60, il identifie le lymphome B agressif, qui depuis porte son nom<sup>14,15</sup>.

En raison de la distribution climatique et géographique de ce lymphome, Burkitt a longtemps suspecté une étiologie environnementale ou infectieuse mais il n'est pas parvenu à en identifier l'agent étiologique<sup>16,17</sup>.

Suite à une conférence donnée par Denis Burkitt, Michael Anthony Epstein, Yvonne Barr et Bert Achong s'associent et parviennent à mettre en évidence un virus, semblable aux herpèsvirus connus à l'époque, qui sera baptisé Epstein-Barr Virus (EBV).

Cette découverte a été réalisée grâce à l'observation par microscopie électronique de particules virales présentes dans des cultures de cellules dérivées d'un lymphome de Burkitt<sup>18</sup>.

Quatre ans plus tard, des études séro-épidémiologiques démontrèrent qu'EBV infecte plus de 90% de la population adulte mondiale et qu'il constitue l'agent causal de la mononucléose infectieuse ou MNI<sup>19</sup>. Par ailleurs, EBV est le premier virus à avoir été reconnu comme directement oncogène chez l'homme et on estime à environ  $2.10^5$  chaque année le nombre de nouveaux cancers associés à EBV (cf. Introduction, Partie 1, VIII.2.).

En effet, depuis sa découverte, EBV a été associé à plusieurs types de cancers :

- des carcinomes dont les carcinomes nasopharyngés<sup>20-22</sup> ou gastriques<sup>23-26</sup>,
- à plusieurs types de proliférations lymphoïdes<sup>27</sup> dont notamment le lymphome de Hodgkin<sup>28</sup>, le lymphome de Burkitt<sup>29</sup>, des lymphomes B<sup>30</sup> et des lymphomes T et NK<sup>31</sup> avec une plus forte incidence chez les individus immunodéprimés<sup>32,33</sup>.

Enfin, ces dernières années, le rôle pathogène d'EBV dans différents types de maladies inflammatoires chroniques (orales, autres ...) et auto-immunes a été mis en évidence et sera largement discuté dans ce mémoire (cf. Introduction, Partie 1, VIII.4.).

### II. Épidémiologie

Aujourd'hui, les données épidémiologiques indiquent que plus de 95% de la population mondiale adulte est infectée par EBV de manière chronique<sup>34</sup>. Si aucune région, ni aucun pays, ne sont épargnés, l'âge moyen auquel survient la primo-infection varie selon les conditions socio-économiques. Dans les pays en voie de développement, presque tous les enfants rencontrent le virus très précocement, entre 1 et 4 ans.

Au contraire, dans les pays industrialisés et à niveau d'hygiène supérieur, moins de la moitié des enfants entre 5 et 10 ans ont des anticorps et dans ces pays, l'infection primaire survient fréquemment au moment de l'adolescence ou chez le jeune adulte. Bien que l'infection primaire soit généralement asymptomatique dans l'enfance, elle provoque la MNI dans environ un tiers des cas si elle survient à l'adolescence ou à l'âge adulte<sup>34</sup>.

Actuellement, deux sous-types d'EBV (EBV-1 et EBV-2) sont caractérisés. Ils diffèrent l'un de l'autre par la séquence de certains gènes de latence dont EBNA-2<sup>35,36</sup> et EBNA-3A, -3B et -3C<sup>37</sup>. L'infection d'un individu en Amérique du Nord et en Europe relève en général du sous-type 1. Seulement 5 à 8% des personnes sont infectées par le sous-type 2 dans les pays occidentaux. En Afrique, et surtout dans les zones de lymphomes de Burkitt endémiques, plus de 20% de la population saine est porteuse d'EBV-2. Également, les situations d'immunodépressions et notamment l'infection par le VIH se caractérisent par une augmentation de la prévalence d'EBV-2 et par la fréquence des co-infections EBV-1/EBV-2<sup>38</sup>.

### III. Classification virologique

EBV, ou herpès virus humain 4 (HHV-4), est l'un des huit herpèsvirus humains (famille des *Herpesviridae*). Il s'agit d'assez gros virus à ADN double brin, enveloppés, de symétrie cubique. La structure externe faite d'une enveloppe phospholipidique rend ces virus plus fragiles dans le milieu extérieur<sup>34</sup>. Une des caractéristiques biologiques essentielles des herpèsvirus est de pouvoir persister indéfiniment chez leur hôte (infection persistante) grâce à une alternance de phases quasi-silencieuses, dites phases de latence (faible exposition immunitaire), et de phases de réplication active, dites phases productives ou lytiques, au cours desquelles de nouveaux virions infectieux sont produits.

La famille des *Herpesviridae* est divisée en trois sous-familles sur la base des propriétés biologiques des virus et des homologies entre leurs génomes, on distingue les *Alphaherpesvirinae*, les *Bethaherpesvirinae* et les *Gammaherpesvirinae*.

La sous-famille des *Alphaherpesvirinae* comprend le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1 ou HHV-1), de type 2 (HSV-2 ou HHV-2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV ou HHV-3). La sous-famille des *Bethaherpesvirinae* comprend le cytomégalovirus (CMV ou HHV-5), le virus de l'herpès humain 6 associé à la roséole (HHV-6) et le virus de l'herpès humain 7 (HHV-7).

La sous-famille des *Gammaherpesvirinae* comprend le HHV-8 associé au sarcome de Kaposi et EBV (HHV-4). Ce dernier appartient au genre des lymphocryptovirus (LCV) et les virus de cette sous-famille sont notamment caractérisés par leur capacité à persister dans les cellules lymphoïdes.

Bien que globalement stable, le génome EBV contient des régions variables, en particulier la séquence EBNA-2<sup>35,36</sup>. La variabilité génétique d'EBV confère au virus des propriétés biologiques différentes dont les conséquences commencent à être envisagées notamment au niveau immunitaire et pathologique<sup>39</sup>. Par exemple, il a été documenté une forte association entre l'évolution de la sclérose en plaque et la présence de certaines variantes génomiques d'EBV<sup>40</sup>.

#### IV. Organisation, génome et structure

Les *Herpesviridae* présentent comme principaux éléments de structure, un génome à ADN bicaténaire de grande taille (125 à 240 kb), une symétrie de capsid cubique et une enveloppe virale.

Le virion EBV présente une forme sphérique (*Figure 1*) d'un diamètre de 120 à 180 nm. La particule virale comprend (de l'extérieur vers l'intérieur) :

- une enveloppe contenant plusieurs types de glycoprotéines<sup>41</sup> qui jouent des rôles séquentiels dans l'attachement du virus (gp350) et la fusion avec la membrane cellulaire (gB, gH, gL, gp42),
- un tégument composé de protéines virales situé entre la capsid et l'enveloppe externe,
- une capsid protéique composée de 162 capsomères, dont la protéine de capsid VCA est très antigénique, entoure un noyau interne contenant l'ADN viral.

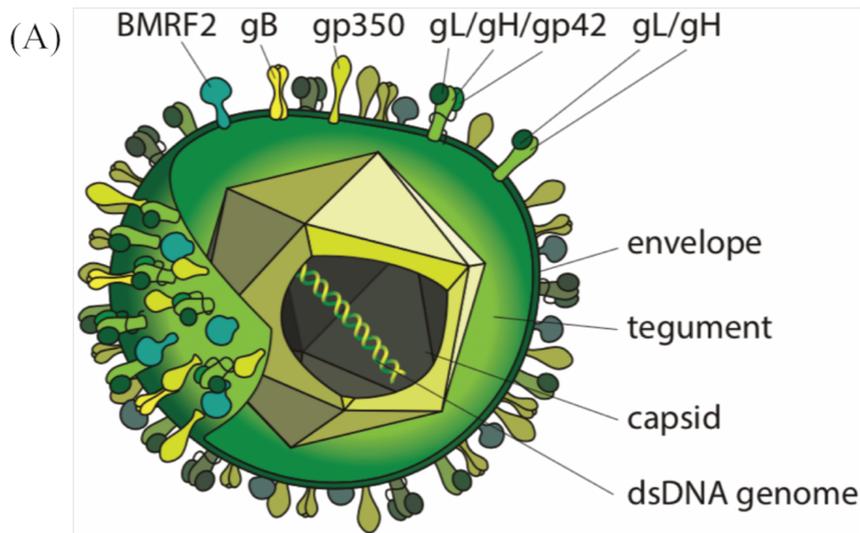
Le génome EBV a été complètement séquencé en 1984 et consiste en un ADN double brin de 172 000 à 184 000 paires de bases (pb) selon les souches qui code pour environ une centaine de gènes. À l'intérieur du virion, la molécule d'ADN se présente toujours sous une forme linéaire non close. La structure du génome EBV se divise en 2 domaines uniques, un domaine long (UL, Long Unique region) et un domaine court (US, Short Unique region) qui contiennent presque toutes les capacités de codage du génome. Ces deux domaines sont séparés par des séquences répétées en tandem qui constituent la région répétée interne 1 (IR1, internal repeat 1).

Dans le domaine UL, il existe trois autres séquences répétées internes (IR2, IR3 et IR4) qui divisent le domaine UL en quatre domaines uniques (U1, U2, U3 et U4). Le génome du virus sous forme linéaire est flanqué à ses deux extrémités de deux séquences répétitives (TR, terminal repeat) constituées suivant les souches de 4 à 12 répétitions en tandem d'une séquence de 550 pb.

Après infection et pénétration du virus dans la cellule, le génome viral est circularisé par attachement covalent des deux séquences TR<sup>42</sup>. C'est sous cette forme épisomale que le virus persiste dans la cellule de manière latente et que la réplication du génome peut s'opérer.

Pendant la phase de latence, le génome EBV est répliqué de façon synchrone avec celui de la cellule infectée au cours de la phase S du cycle cellulaire. Ce mécanisme est rendu possible grâce à la présence de l'origine de réplication *oriP* sur laquelle se fixe la protéine de latence EBNA-1 qui sert d'adaptateur avec la machinerie de réplication cellulaire.

Par ailleurs, à proximité des régions IR2 et IR4, existent deux autres régions homologues nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences sont les deux origines de réplication qui sont utilisées pendant la phase lytique (*oriLyt*) qui aboutira à la production d'un très grand nombre de génomes grâce à la polymérase virale (cf. Introduction, Partie 1, VI.).



(B)



Figure 1 : Représentations schématiques de la structure et du génome du virus Epstein-Barr<sup>43,44</sup>. (A) Le génome est placé à l'intérieur d'une capsidie icosaédrique entourée d'une enveloppe (bicouche lipidique) contenant des glycoprotéines (gp) virales en saillie impliquées dans les mécanismes d'attachement et d'entrée du virus dans la cellule cible. La gp350 interagit spécifiquement avec le CD21 présent sur les lymphocytes B (LB) et définit le tropisme d'EBV pour ces cellules. Les particules produites à partir de de LB sont riches en dimères gH/gL alors que les particules EBV dérivées de cellules épithéliales sont riches en trimères gp42/gH/gL. L'abondance relative de ces différentes gp joue un rôle clé dans les mécanismes qui facilitent l'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales et les LB, respectivement. (B) Organisation génétique du génome EBV. Le virion EBV est composé d'un génome ADNdb de 172kb pour la souche prototype de type 1 B95-8 (ATCC® VR-1544™). Les positions des origines de la répllication latente et lytique du génome viral, respectivement oriP et oriLyt, sont illustrées par des cases noires. Les gènes sélectionnés et leur placement relatif sont représentés par des flèches pointées dans la direction de la traduction. À l'état latent, seuls une dizaine d'antigènes sont exprimés, notamment EBNA-1, LMP-1 et -2A/B (en vert). La répllication lytique commence par l'induction des facteurs de transcription précoces BZLF-1 et BRLF-1 (rouge), qui activent les promoteurs viraux précoces générant le complexe d'initiation chez oriLyt et consistant en 6 produits géniques viraux (orange). Au cours du cycle lytique, divers antigènes lytiques sont exprimés (jaune). Les produits géniques de BMRF-1, BCLF-1 et BALF-4 sont décrits respectivement par EA / D, VCA p160 et VCA gp110.

## V. Infection par EBV : aspects cellulaires

EBV a la capacité d'infecter différents types cellulaires in vivo. Les lymphocytes B (LB) représentent la cellule hôte préférentielle pour EBV. L'infection des LB par l'EBV in vitro aboutit à leur immortalisation et la génération de lignées de cellules lymphoblastoïdes (LCL).

EBV peut également infecter les cellules épithéliales et plus rarement les cellules T (EBV-2), les cellules NK, les monocytes et les cellules musculaires<sup>34</sup>.

## 1. Mécanismes d'infection du lymphocyte B par EBV

Le tropisme d'EBV pour les LB est lié à la présence de la protéine CD21 (également CR2) qui constitue le récepteur majeur d'EBV. CD21/CR2 est physiologiquement le récepteur pour la composante C3d du complément et également un ligand de la protéine CD19. Cette protéine est principalement exprimée dans la membrane plasmique des lymphocytes B matures<sup>45,46</sup> et des cellules folliculaires dendritiques.

L'infection des LB par EBV commence grâce à l'interaction de haute affinité entre la glycoprotéine de l'enveloppe virale (gp350/220) et CD21<sup>47</sup>. Cette fixation induit les signaux initiaux d'activation des lymphocytes B et d'endocytose du virus. La fusion de l'enveloppe virale et de la membrane des endosomes requiert l'interaction du complexe viral gp25/gL-gp85/gH-gp42 avec les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II : HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ)<sup>48-50</sup>. L'extrémité N-terminale de la gp42 est un site d'interaction important avec gL et gH, ce qui maintient la liaison avec le CMH-II. La liaison entre gp42, gL et gH fait intervenir les acides aminés 36 à 81. La protéine gH, nécessite la présence de gL pour se replier (« fold ») correctement et pour être transportée jusqu'à la membrane de la cellule cible. La protéine gL stabilise, participe au repliement et à l'expression de la protéine gH<sup>48</sup>.

Le cycle de multiplication d'EBV dans le lymphocyte B suit le schéma classique des *Herpesviridae* qui comporte les étapes d'attachement, de pénétration, de décapsidation et des étapes de synthèse des macromolécules (acides nucléiques et protéines). Après entrée par fusion, la décapsidation permet au génome d'être transporté dans le noyau où il persiste comme un épisome, épisome souvent comparé à un « mini-chromosome circulaire » qui sera répliqué par la machinerie cellulaire à chaque mitose. Au cours des phases productives, l'ADN polymérase virale accomplit dans le noyau une réplication virale du génome aboutissant à la production d'un grand nombre de génomes viraux. Ces étapes sont fréquemment divisées en trois phases (précoce-immédiate, précoce et tardive) et vont permettre l'assemblage des nucléocapsides puis le bourgeonnement et la libération des virions infectieux associée à la lyse de la cellule infectée<sup>51</sup>.

## 2. Mécanismes d'infection des cellules épithéliales par EBV

Il est établi que l'EBV est capable d'infecter les cellules épithéliales *in vivo* et *in vitro*<sup>34</sup>.

*In vitro*, différents modèles existent, par exemple un travail récent met en évidence la capacité d'EBV de se multiplier dans des épithéliums stratifiés produits *in vitro*<sup>52</sup>.

*In vivo*, le tropisme épithélial d'EBV est principalement observé dans plusieurs situations pathologiques, dont les carcinomes du nasopharynx<sup>53</sup> et gastriques<sup>54</sup>, la leucoplasie chevelue de la langue<sup>55,56</sup> et plus récemment nos propres travaux<sup>13</sup> ont mis en évidence la présence d'EBV dans les cellules des épithéliums parodontaux au cours de l'inflammation parodontale. Cependant l'infection des cellules épithéliales n'est pas évidente à comprendre dans la mesure où ces cellules sont dépourvues de CD21, même si des transcrits CD21 ont été retrouvés dans quelques cellules épithéliales amygdaliennes<sup>57</sup>. Les cellules épithéliales n'expriment également pas le CMH-II. Ces éléments suggèrent que le mécanisme d'entrée EBV dans les cellules épithéliales diffère de celui décrit pour le lymphocyte B.

Les données de la littérature montrent en effet que des virus génétiquement modifiés et n'exprimant pas la protéine gp350/220 peuvent tout de même infecter des lymphocytes B et des cellules épithéliales, ce qui semble indiquer que d'autres composants viraux de l'enveloppe permettent l'entrée du virus dans les cellules hôtes<sup>58</sup>. De plus, la fusion de la membrane virale avec la cellule épithéliale est inhibée par un peptide résiduel sous forme soluble de la gp42 (peptide 36-81) bloquant l'interaction avec gH/gL<sup>59</sup>. Ce résultat implique que l'interaction entre la gp42 et gH/gL est une caractéristique fondamentale dans la fusion membranaire médiée par EBV<sup>60</sup>.

Se basant sur ces données, l'équipe de A.N. Kirschner a suggéré un modèle d'inhibition peptidique de la fusion membranaire EBV dans lequel la fusion de la membrane des LB avec EBV n'a lieu que si le domaine lectine de la gp42 est fourni en « cis » avec la région N-terminale. Dans ce modèle, le peptide 36-81 est un inhibiteur puissant de la fusion membranaire à la fois des cellules épithéliales et des LB<sup>61</sup>. Ce qui suggère fortement que les mécanismes de fusion responsables de l'entrée d'EBV dans le lymphocyte B et la cellule épithéliale sont identiques.

En l'absence de CMH-II et de CD21, l'efficacité de l'infection *in vitro* des cellules épithéliales par EBV varie fortement<sup>62</sup>. Cependant, l'équipe de S. Imai a mis en évidence *in vitro*, que l'infection des cellules épithéliales par EBV pouvait être améliorée grâce à une co-culture des cellules épithéliales avec les lignées de cellules B Akata productrices de particules EBV<sup>63</sup>.

Par ailleurs, le groupe de C.D. Shannon-Lowe a décrit un procédé de « transport de l'infection », où EBV pourrait efficacement accéder à l'épithélium en étant transporté à la surface de LB qui agiraient comme des véhicules « EBV-coated B Lymphocytes »<sup>64</sup>.

Cette équipe a confirmé cette hypothèse en montrant que des cellules épithéliales primaires d'amygdales étaient plus facilement infectées en co-culture avec des LB isolés du sang périphérique infectés par EBV. Ces travaux ont permis de mettre en évidence le mécanisme de transfert de l'infection EBV entre le LB et la cellule épithéliale. Cette étude met notamment en évidence que la présence EBV facilite l'adhésion des LB aux cellules épithéliales. En effet, la liaison d'EBV au CD21 induit l'activation du LB et provoque le recouvrement de sa surface par le CD 21 et par différentes molécules de surface dont les tétraspanines. Les LB activés par EBV sont alors capables de former des produits conjugués avec les cellules épithéliales grâce aux molécules d'adhésion qui recouvrent la surface du LB (ces produits conjugués lymphocyte B/cellule épithéliale peuvent être observés même en absence EBV lorsque CD21 est activé par un agoniste). De plus, il a été observé que le point de contact entre les deux cellules est particulièrement riche en CD21.

En conclusion, l'interaction entre LB et cellules épithéliales est spécifiquement médiée par des molécules d'adhésion actives, qui apparaissent à la surface du LB activé, notamment en réponse à une stimulation médiée par CD21. L'interaction étroite qui résulte des « gap de jonction » ainsi formés, entre cellules épithéliales et LB infectés, pourrait permettre le transfert d'EBV de la surface du lymphocyte B vers la cellule épithéliale<sup>65</sup>.

Récemment, il a été mis en évidence que la neuropiline 1 ou NRP1, un co-récepteur des sémaphorines de classe III et de nombreux facteurs de croissance, peut augmenter l'activité des récepteurs tyrosine kinases<sup>66</sup> et améliorerait nettement l'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales nasopharyngées<sup>67</sup>.

De plus, cette même équipe a, au travers d'analyses de criblages par microarray et d'interférence par ARN, fait une découverte majeure en montrant que la protéine Ephrin A2 (EphA2) est nécessaire pour l'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales. En effet, leurs expériences ont montré que la surexpression de l'EphA2 a augmenté l'infection par les cellules épithéliales d'EBV et à contrario l'utilisation d'anticorps dirigés contre EphA2, du ligand soluble de l'EphA2 (EphrinA1) et d'un inhibiteur de l'EphA2 (l'acide 2,5-diméthylpyrrolylbenzoïque) ont efficacement bloqué l'infection des cellules épithéliales EBV. Mécaniquement, EphA2 interagit avec les protéines d'entrée d'EBV, gH/gL et gB, pour faciliter l'internalisation et la fusion d'EBV<sup>68</sup>. Ce résultat majeur a été confirmé de manière quasi-simultanée par l'équipe américaine du Pr. R. Longnecker déjà à l'origine de la description des principaux mécanismes d'entrée d'EBV dans le LB<sup>69</sup>. Ces travaux identifient donc EphA2 comme le récepteur fonctionnel de l'entrée d'EBV dans les cellules épithéliales et offre de nouvelles stratégies pour bloquer l'infection à EBV.

## VI. Cycle biologique d'EBV

Malgré plus de cinquante années de recherches intensives, les détails du cycle biologique in vivo d'EBV restent encore assez incertains et cela principalement parce que l'infection initiale par le virus est généralement asymptomatique.

### 1. Infection primaire

L'infection primaire à EBV concerne essentiellement le tissu muqueux de l'oropharynx. Cette infection est souvent le résultat de l'ingestion de cellules infectées ou d'exposition à des virions libres par contact salivaire (*Figure 2*).

Cette transmission se produit dès la petite enfance à cause du partage des ustensiles et des jouets ou à l'adolescence. Le virus se trouve également dans les sécrétions génitales, mais il est peu probable que la transmission sexuelle directe se fasse en l'absence de contact salivaire<sup>70</sup>.

Une fois dans l'hôte, nous savons peu de choses sur la façon dont le virus infecte la population de LB mais deux modèles prédominent<sup>71</sup>.

Le premier modèle suggère que l'EBV pourrait accéder directement aux lymphocytes B naïfs dans des régions de l'oropharynx riches en cellules lymphoïdes, comme dans les cryptes amygdaliennes<sup>72</sup>. Dans ce modèle, les structures cryptiques de l'amygdale, formées par invagination du lympho-épithélium amygdalien, pourraient permettre un accès direct de la salive contenant EBV aux LB du tissu lymphoïde sous-jacent<sup>73</sup>.

Le deuxième modèle suggère que l'EBV infecte d'abord les cellules épithéliales oropharyngiennes, qui subissent ensuite un cycle lytique pour amplifier le nombre de virions qui peuvent à leur tour infecter les LB sous-jacentes avec un nouveau virus de la progéniture<sup>74</sup>. Plusieurs observations soutiennent cette théorie dont la présence d'EBV dans les cellules épithéliales oropharyngées desquamées de patients atteints de mononucléose infectieuse<sup>75</sup>, la présence d'ADN, d'ARNm et de protéines EBV dans les cellules de l'épithélium amygdalien issus de donneur sain<sup>76</sup> et l'observation de la réplication d'EBV dans l'épithélium de langue saine suggèrent que la langue pourrait être la source de la sécrétion d'EBV dans la salive chez des patients immunodéprimés<sup>77</sup>. Dans un travail récent, notre laboratoire a établi pour la première fois que les épithéliums parodontaux étaient infectés par EBV, mais rien n'indique encore à ce stade, que cette infection de l'épithélium parodontal survienne au cours de la primo-infection EBV<sup>13</sup>.

Toutefois, la détection de cellules épithéliales orales infectées par EBV reste rare chez l'individu en bonne santé et l'hypothèse d'une infection des tissus épithéliaux oraux au stade initial de l'infection reste encore très hypothétique<sup>74,78</sup>.

De plus, un travail récent, basé sur l'analyse prospective des paramètres biologiques de l'infection EBV pendant la période d'incubation<sup>79</sup>, montre que le virus est très rapidement détecté dans le sang, bien avant les étapes d'amplification de la réplication virale dans les structures orales et la production salivaire. Ainsi, l'augmentation de la charge virale sanguine précéderait de plusieurs semaines l'augmentation de la charge virale orale ce qui suggère que l'infection des tissus lymphoïdes oraux précède l'infection des tissus épithéliaux oraux.

Il semblerait que la réplication d'EBV est auto-limitée dans la cavité buccale et que l'infection est établie pendant plusieurs semaines avant que les cellules infectées par le virus ne pénètrent dans le sang périphérique et initient une réponse immunitaire innée et adaptative<sup>79</sup>.

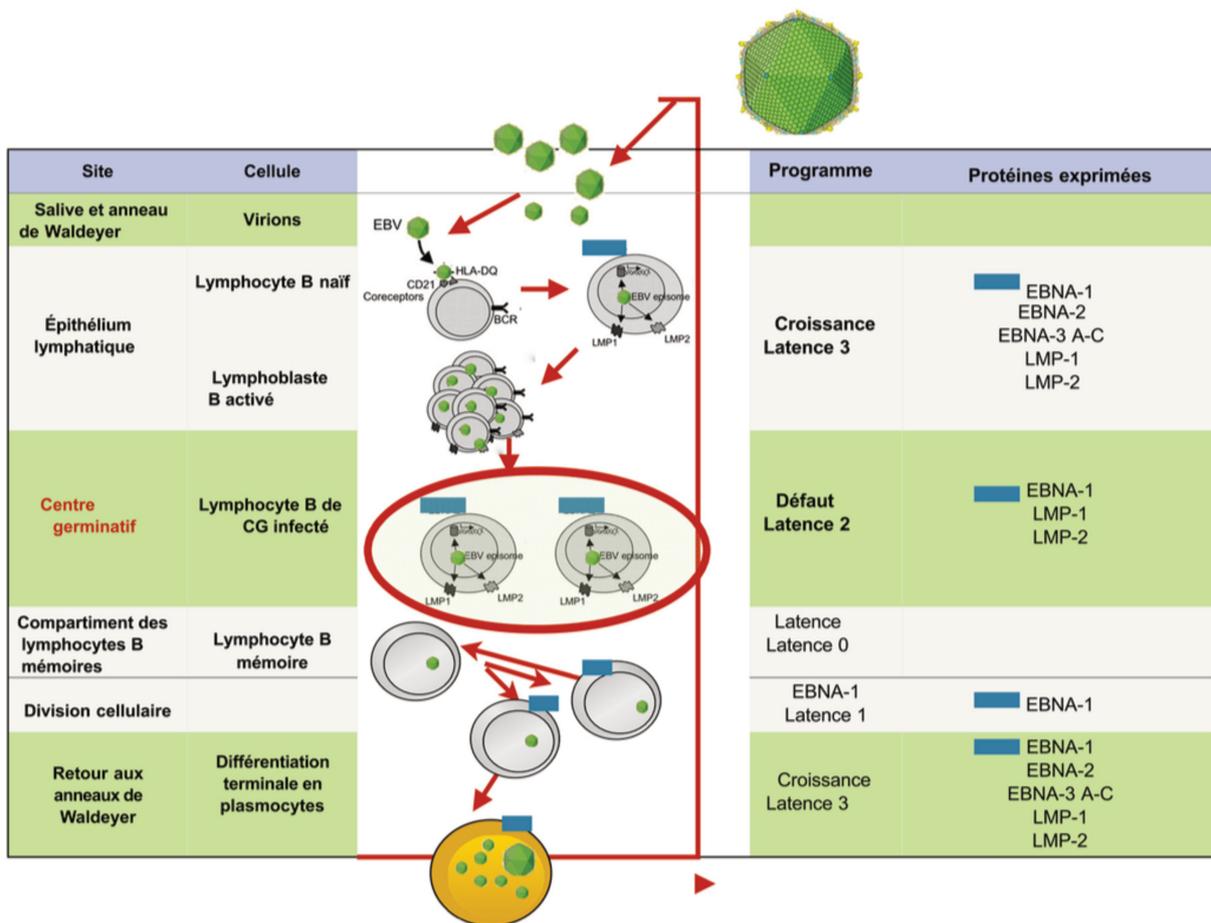


Figure 2 : Principaux évènements associés à l'infection EBV<sup>80</sup>.

## 2. Mise en place d'une infection latente persistante

Globalement, EBV infecte principalement les lymphocytes B naïfs quiescents résidents de l'amygdale, puis il active ces lymphocytes de manière analogue à une stimulation antigénique et persiste à vie dans les lymphocytes B devenus « mémoire ».

Le principal modèle décrivant comment les LB infectés établissent un pool de virus dans les lymphocytes B mémoire est le modèle du « centre germinatif »<sup>81</sup> (*Figure 3*). Ce modèle, bien documenté aujourd'hui, propose que les lymphocyte B naïfs infectés ainsi que leurs homologues non infectés sont acheminés vers les centres germinatifs des ganglions lymphatiques, ils subissent un changement de classe et une hyper-mutation somatique pour devenir des lymphocytes mémoires (soit le processus normal de maturation des lymphocytes B).

À ce stade, les cellules B qui portent une nouvelle immunoglobuline de surface (Ig) d'affinité élevée pour l'antigène survivent, tandis que celles qui portent une Ig d'affinité plus faible sont éliminées par apoptose. Cependant, l'expression des protéines virales LMP1 et LMP2 protègent les cellules B infectées de l'apoptose<sup>82</sup> leur permettant de se différencier en cellules mémoire et de retourner dans la circulation fournissant ainsi un pool de virus dans le sang (environ une cellule pour  $10^{5-6}$  LB du sang périphérique). Chez les porteurs sains, infectés par EBV, le virus se trouve presque exclusivement dans le compartiment des lymphocytes B mémoires. Ces LB mémoires circulants contiennent l'épisome d'EBV et n'expriment pas de protéines virales, si ce n'est la protéine EBNA-1 exprimée transitoirement au cours de mitoses pour assurer la réplication du génome. L'absence remarquable d'expression antigénique permet aux cellules infectées d'échapper à la vigilance immunitaire et notamment au lymphocyte T (LT)<sup>83</sup>.

Cependant, EBV peut être également détecté dans des LB commutés non-isotypiques<sup>84</sup>, ce qui suggère l'existence d'une voie d'infection indépendante du centre germinatif. Ceci est mis en évidence dans le cas du syndrome lympho-prolifératif lié à l'X où la formation du centre germinal est absente et pourtant le virus persiste dans les LB mémoires non commutés<sup>85</sup>.

EBV pourrait donc aussi être capable de transformer les LB naïfs en LB mémoires sans avoir besoin du centre germinatif.

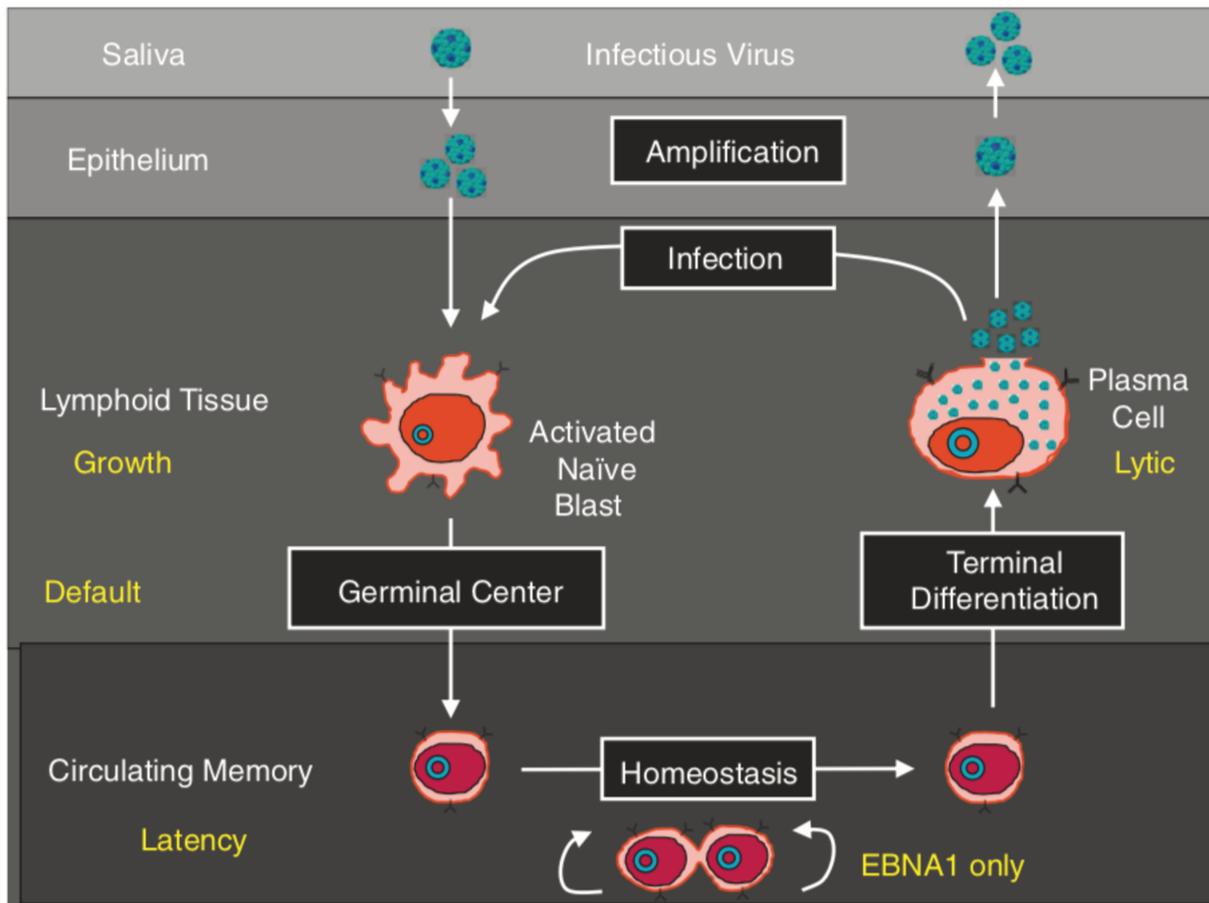


Figure 3 : Le modèle du centre germinatif et de la persistance EBV<sup>86</sup>.

Le virus apporté par la salive pénètre dans le tissu lymphoïde de l'anneau de Waldeyer (amygdales) après avoir traversé la barrière épithéliale pour infecter directement les lymphocytes B naïfs. L'expression de l'ensemble des 9 protéines de latence virale régulatrices (program type III, growth program), active les LB quiescents qui se transforment en blastes qui prolifèrent et migrent dans le centre germinatif (CG). Positionnées dans le CG, le programme viral de latence est restreint à 3 protéines de latence, (program type II, default program). Les cellules peuvent alors quitter le CG sous le phénotype de lymphocytes B mémoires infectés de manière latente exprimant uniquement la protéine EBNA1 (program type I, EBNA1 only). Le compartiment mémoire est considéré comme le site de la persistance à long terme parce que l'exposition antigénique du virus est quasi-nulle et donc invisible pour la réponse immunitaire. À tout moment, un petit sous-ensemble de lymphocytes mémoires B infectés de manière latente initie une réactivation lytique en association avec des signaux de différenciation terminale. Ce processus aboutit à la libération de virus infectieux qui peuvent être excrétés dans la salive pour une propagation infectieuse ou infecter de nouveaux lymphocytes B naïfs, complétant ainsi le cycle.

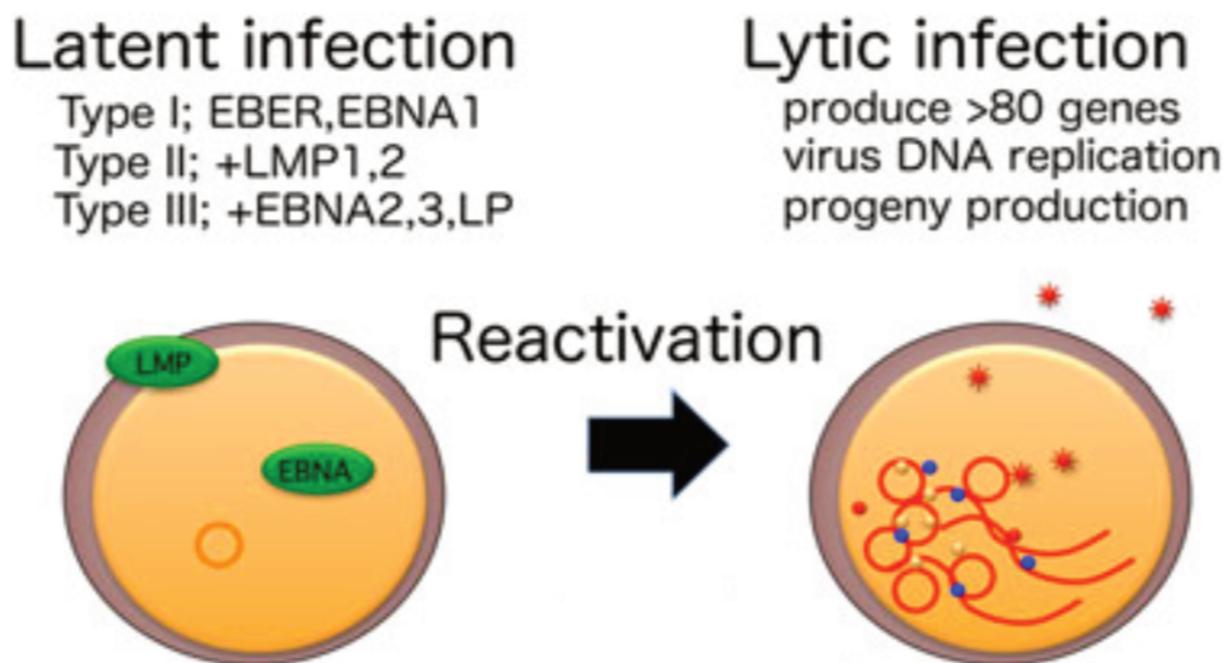
### 3. Activation du lymphocyte B infecté et basculement vers la phase lytique

Afin d'infecter de nouveaux hôtes et de maintenir dans l'organisme un pool de cellules B infectées, le virus doit être épisodiquement stimulé pour entrer dans une phase productive (lytique). La réplication lytique virale peut se produire à la fois dans les LB et dans les cellules épithéliales oropharyngées.

Dans LB, il est bien établi que la réactivation lytique est induite par la différenciation des LB mémoires en plasmocytes<sup>87</sup>. Il est également admis que l'infection épithéliale est essentiellement de nature lytique dans les cellules épithéliales différenciées<sup>78</sup> où le virus est excrété dans la salive et diffuse ainsi vers de nouveaux hôtes sensibles (*Figure 2*).

La réactivation est le passage de la forme latente à la forme lytique (*Figure 4*). Elle correspond à la phase au cours de laquelle les machineries enzymatiques virales et cellulaires sont exploitées pour la réplication du génome viral, l'expression des protéines du cycle lytique et la production de nouveaux virions infectieux. Ceci conduit généralement à la mort de la cellule hôte d'où la qualification de cycle lytique. L'infection lytique par l'EBV se produit in vivo spontanément au cours de l'infection primaire et de manière sporadique au cours de l'infection persistante lorsque les lymphocytes B mémoires infectés sont stimulés et se différencient en plasmocytes (PC)<sup>87</sup>.

Dans les deux cas, la réplication lytique implique l'expression séquentielle des antigènes viraux lytiques couplée à l'activation plasmocytaire (*Figure 5*).



*Figure 4 : Cycle biologique biphasique d'EBV<sup>88</sup>.*

*La persistance d'EBV dans l'organisme est la conséquence directe de la capacité de ce virus à pouvoir maintenir indéfiniment son génome (cercle orange) dans une cellule infectée grâce à l'expression minimale de quelques protéines de latence (ici EBNA et LMP). Cette phase de latence peut apparaître sous la forme de différents programmes caractérisés par l'expression de différents groupes de gènes viraux (type I, II, III). La réactivation du virus fait basculer la phase de latence vers la phase lytique grâce à l'expression de plus de 80 gènes, dont la polymérase virale qui amplifie la réplication de l'ADN du virus et la genèse de nouveaux virions infectieux.*

Les produits des gènes viraux très précoces « immediate early (IE) » activent l'expression des gènes précoces « early antigens (EA) ». En particulier, Zta et Rta sont 2 protéines IE codées respectivement par les gènes *BZLF1 (ZEBRA)* et *BRLF1 (Rta)* qui agissent comme des trans-activateurs capables d'induire l'expression des gènes viraux précoces.

Zta apparaît comme le facteur transcriptionnel clé qui contrôle le basculement de la phase de latence vers la phase lytique. Zta se fixe au niveau de l'origine de réplication tardive du génome EBV (*oriLyt*) et active l'expression de la plupart des gènes précoces<sup>89</sup>. Zta peut également réguler négativement le promoteur Cp qui contrôle l'expression des gènes de latence des Epstein-Barr Nuclear Antigen (EBNA) ce qui facilite la commutation entre la latence et le cycle lytique.

Rta apparaît dans le cycle lytique suite à l'activation de son expression par Zta. Il se lie également à *oriLyt*<sup>90</sup> bien que son rôle ne semble pas être indispensable à la réplication génomique. Cette protéine joue aussi un rôle dans la commutation latence / cycle lytique<sup>91</sup>. Dans les cellules épithéliales, Rta semble suffisante pour rompre à elle seule la latence virale.

Les antigènes précoces EA sont classés en deux catégories, les EA-R (restricted) présents dans le cytoplasme et les EA-D (diffuse) localisés dans le noyau et dans le cytoplasme. Les fonctions des protéines précoces sont multiples. Par exemple, la protéine codée par le gène *BRRF1* est un facteur de transcription. D'autres protéines précoces régulent le transport des ARN tardifs et assurent leur stabilité car la plupart des gènes lytiques d'EBV sont dépourvus d'introns et les ARNm non épissés sont souvent instables. À ce titre, la protéine EB2 (codée par *BMLF1*) est très abondante dans le noyau et se lie aux ARN non-épissés et améliore leur stabilité<sup>92</sup>.

D'autre part, la protéine régulatrice de l'apoptose BHRF1 possède de fortes homologies avec la protéine cellulaire Bcl-2 qui protège la cellule contre l'apoptose. L'action anti-apoptotique de BHRF1 permet une meilleure réplication virale en prévenant la mort de la cellule hôte.

Parmi les protéines précoces, on trouve notamment de nombreuses protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral :

- l'ADN polymérase virale (*BALF5*) et son facteur de processivité (*BMRF1*),
- une protéine majeure de liaison à l'ADN simple brin (*BALF2*),
- la ribonucléotide réductase (*BaRF1*),
- la thymidine kinase (*BXLF1*),
- l'exonucléase alcaline (*BGLF5*),
- le complexe hélicase/primase (*BBLF4/BSLF1*),
- un composant épissé du complexe hélicase/primase (*BBLF2/3*),
- l'uracyl ADN glycosylase (*BKRF3*).

Les protéines exprimées lors de la phase tardive sont principalement des protéines de structure composant la capsidie et l'enveloppe virale. La capsidie est composée essentiellement de la protéine majeure de la capsidie (VCA) codée par le gène *BCLF1* mais également de la protéine de capsidie triplex 1 (*BORF1*), de la protéine de capsidie triplex 2 (*BDLF1*), la petite protéine de capsidie (*BFRF3*) et de protéines de charpente dont l'assembline (*BVRF2*). Les glycoprotéines de l'enveloppe virale sont codées par les cadres de lectures suivants : *BLLF1* (gp350/220), *BALF4* (gp110), *BXLF2* (gp85), *BILF2* (gp55/80) et *BDLF3* (gp42).

À côté des protéines de structure, on identifie des protéines immuno-régulatrices comme la protéine virale vIL-10 codée par le gène *BCRF1* qui présente une forte homologie avec l'IL-10 cellulaire et qui semble jouer un rôle important pour protéger le virus contre la réponse immunitaire<sup>93</sup>.

La production de nouveaux virions commence par la synthèse de l'ADN viral et l'assemblage de la nucléocapside d'EBV se déroule à l'intérieur du noyau de la cellule hôte. Les nucléocapsides contenant une copie de l'ADN viral gagnent une première enveloppe par bourgeonnement avec la membrane nucléaire cellulaire. Ensuite, il y aurait une fusion de l'enveloppe primaire avec la membrane du réticulum endoplasmique, ce qui causerait la perte de l'enveloppe et la libération de la capsidie nue dans le cytoplasme. En parallèle, les capsides pourraient migrer via l'appareil sécrétoire (appareil de Golgi) de la cellule hôte où il y aura maturation in situ des structures virales. La dernière étape est constituée par le bourgeonnement final vers l'intérieur d'une vésicule du trans-golgi qui apportera le virus pourvu d'une nouvelle enveloppe à l'extérieur de la cellule. Cette dernière enveloppe porte à la fois des protéines membranaires cellulaires mais aussi plusieurs glycoprotéines virales qui y ont été ancrées suite à leur synthèse. Ainsi, la capsidie virale passe par différentes étapes d'enveloppement et de ré-enveloppement avant d'être relarguée à l'extérieur de la cellule hôte<sup>94</sup>.

La régulation de la réactivation EBV dans le LB est un élément essentiel du cycle viral. On observe une association étroite entre l'état de différenciation des cellules B et la capacité d'EBV à passer du stade latent au stade lytique. En effet, la réactivation virale dans les lignées LCL est inversement corrélée à l'expression d'EBF1, PAX5 et Oct-2 qui sont des facteurs de transcription clés qui contrôlent la différenciation B<sup>95</sup>. PAX5 et Oct-2 facilitent la latence virale en interagissant avec Zta et en inhibant sa capacité à activer la transcription des gènes viraux lytiques et précoces<sup>96,97</sup>. De manière intéressante, la stimulation du récepteur antigénique du lymphocyte B (BCR) et la différenciation plasmocytaire conduisent à la perte de l'expression de ces facteurs (EBF1, PAX5 et Oct-2). Il est à noter que dans les LB, la réplication lytique peut être inhibée même en présence d'un niveau d'expression élevé de *BZLF1* dans la situation d'une hyper méthylation des promoteurs des gènes précoces, cette régulation épigénétique empêche *BZLF1* d'induire leur expression<sup>98,99</sup> (*Figure 5*).

Chez l'homme, la réactivation du virus est probablement déclenchée en grande partie par la stimulation du BCR et par la différenciation des LB en PC<sup>87,95</sup> (*Figures 3 et 5*).

Deux facteurs transcriptionnels cellulaires jouent un rôle critique dans ce processus de différenciation. Le facteur XBP-1 (X-box binding protein-1) est un membre de la famille des protéines CREB/ATF dont le variant épissé, XBP-1s, est produit au cours de la différenciation des cellules plasmiques et au cours du stress du réticulum endoplasmique. XBP-1s active la transcription du promoteur viral de *BZLF1* (Zp) et de *BRLF1* (Rp). Son expression est suffisante pour réactiver EBV dans certaines lignées de cellules infectées de façon latente<sup>100</sup>.

Par ailleurs, le facteur de transcription BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protéine-1) codé par le gène *PRDM1* est une protéine de liaison à l'ADN en doigt de zinc, qui fonctionne normalement comme un répresseur, qui induit une réactivation dans certaines lignées cellulaires infectées par EBV et qui active la transcription à la fois de Zp et de Rp<sup>101,102</sup>.

En affectant l'expression des deux gènes lytiques très précoces, ces deux protéines amplifient leurs effets inducteurs du cycle lytique et peuvent probablement réactiver EBV (*Figure 5*).

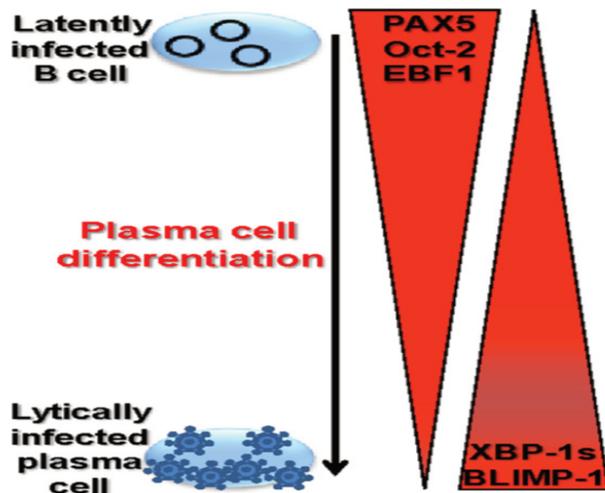


Figure 5 : Induction de la réactivation d'EBV lors de la différenciation plasmocytaire<sup>99</sup>.

Il a été mis en évidence dans des lignées cellulaires lymphoblastoïdes que la réactivation d'EBV est positivement corrélée avec l'expression de XBP-1s (X-box binding protein-1) et de BLIMP-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) et négativement corrélée avec l'expression de Pax5 (Paired Box 5), Oct-2 (Octamer-binding-protein-2) et EBF1 (Early B-Cell Factor 1) dans les plasmocytes.

## VII. Phase de latence d'EBV et rôles des protéines de latence

### 1. Description de la phase de latence

La capacité à se maintenir au travers d'une infection latente chez un hôte est une caractéristique de survie importante des herpèsvirus. En effet, le maintien d'EBV dans les LB résulte d'un subtil équilibre entre la nécessité pour le virus de se répliquer et celle de se maintenir en limitant son exposition antigénique. L'expression génique du virus est donc finement régulée de manière à assurer en permanence une excellente adéquation avec la physiologie du lymphocyte B que le virus peut contrôler à tout moment par l'action régulatrice des protéines de latence. Les différents promoteurs qui gouvernent l'expression virale (Wp, Cp et Qp) permettent d'exprimer de manière coordonnée différents profils d'expression des gènes de latence EBV. Ces profils ont initialement été identifiés dans les tumeurs associées à EBV et dans les lignées de cellules B transformées par EBV. Dans ces scénarios, un nombre limité de gènes de latence sont exprimés en cohérence avec les états prolifératifs des cellules malignes ou transformées.

Ces profils peuvent être classés en différents types de latence (0, I, II et III) et les différentes tumeurs associées à EBV sont caractérisées par un profil type<sup>103</sup>. Cependant, ce modèle doit être considéré comme un cadre général plutôt qu'une liste normative. Par exemple, le lymphome extranodal NK/T (ENKTL) est considéré comme une tumeur de latence II mais LMP1 n'y est pas toujours exprimée<sup>104</sup>. De même, dans les tumeurs LMP1-positives, LMP1 peut être exprimée seulement dans un sous-ensemble de cellules malignes<sup>105</sup>. Malgré cela, la nomenclature de latence 0 / I / II / III est largement utilisée.

Latence 0/I (Figure 3) : Dans les lymphocytes B mémoire circulants, l'expression des gènes du virus est seulement limitée aux petits ARN non-codants EBER (EBV-Encoded RNA) et aucune protéine virale n'est exprimée. Seulement la protéine EBNA-1 qui sert d'adaptateur entre la machinerie de réplication cellulaire et l'épisome viral est transitoirement exprimée si une mitose survient<sup>106</sup>.

Latence I (Figure 3 : « EBNA1 only ») : Ce profil est caractérisé par l'expression de EBNA-1 à partir du Qp, des EBER et des micro-ARN (miARN) viraux, ainsi que par la désactivation des promoteurs Wp, Cp et LMP. La latence I est constamment observée dans le lymphome de Burkitt. Cependant, une évolution vers un phénotype de latence III, avec l'expression d'EBNA-2 et de LMP1, est fréquemment observée dans les lignées cellulaires adaptées du lymphome de Burkitt. Cela suggère que la latence III est le modèle d'expression virale par défaut dans les cellules B en l'absence de contrôle immunitaire de l'hôte.

Latence II (Figure 3 : « default program ») : C'est un modèle intermédiaire d'expression qui a été identifiée à l'origine dans le carcinome du nasopharynx non différencié (NPC). Le lymphome de Hodgkin (HL), le carcinome gastrique et le lymphome extranodal NK/T (ENKTL) sont également associés à ce profil d'expression. La latence II est caractérisée par l'expression d'EBNA-1, des EBER et des miARN viraux (comme la latence I) et des protéines membranaires LMP1, LMP2A et LMP2B.

Latence III (Figure 3 : « growth program ») : Ce profil caractérise les LB transformés in vitro (LCL) ainsi que mais les syndromes lympho-prolifératifs post-transplantation (SLPT)<sup>107</sup>.

Au cours de la MNI, on observe de nombreuses cellules exprimant la latence<sup>108</sup>.

La latence III est caractérisée par l'expression simultanée d'EBNA-1, -2, -3a, -3b, -3c, LMP1 et LMP2. Les protéines EBNA-3 sont des antigènes puissants et constituent une cible directe pour induire l'élimination des LB infectés en prolifération par les LT spécifiques d'EBV

## 1. Rôles des protéines associées à la phase de latence

Il existe 9 antigènes différents associés à l'état latent d'EBV, 6 avec une localisation nucléaire (EBNA-1, -2, -LP, -3A, -3B et -3C) et 3 sur la membrane cellulaire (LMP-1, -2A et -2B). De plus, 2 ARN courts non polyadénylés et donc non traduits sont exprimés pendant la latence EBV (EBER-1 et -2). La transformation des cellules B nécessite l'action coopérative d'au moins 5 gènes latents, et la perte de l'un d'entre eux entraînera une dégradation substantielle du processus de transformation.

### a. La protéine EBNA-1

EBNA-1 est une protéine nucléaire qui permet la réplication de l'épisome EBV circularisé pendant la division cellulaire. EBNA1 sert d'adaptateur moléculaire entre l'épisome et la machinerie de réplication cellulaire. Cette fonction permet la transmission efficace d'un episome viral dans chaque cellule de la descendance cellulaire<sup>109</sup>. EBNA1 protège la cellule contre l'apoptose induite par p53<sup>110</sup> et contribue à l'instabilité génomique cellulaire via l'induction d'espèces réactives de l'oxygène. Dans ce dernier cas, les dommages à l'ADN qui en résultent peuvent expliquer en partie comment EBV contribue à la transformation maligne des cellules<sup>111</sup>.

Également EBNA1 contient une région répétée glycine-alanine qui inhibe sa dégradation et réduit sa présentation par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I de la cellule hôte, réduisant ainsi son immunogénicité<sup>112,113</sup>.

*b. Les protéines EBNA-2, -3 et -LP*

EBNA-2 et EBNA-LP sont les premières protéines exprimées au cours de l'infection latente des cellules B. EBNA-2 est un facteur de transcription strictement nécessaire pour la croissance du lymphocyte induite par EBV et ce facteur active la transcription des protéines cellulaires CD23, CD21 et CMYC<sup>114-116</sup>. EBNA-LP augmente les actions d'EBNA-2 sur les promoteurs de LMP1 et LMP2B, ce qui est important pour la transformation<sup>117</sup>.

Il existe 3 membres de la famille EBNA-3, appelés EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C. La famille de protéines EBNA-3A / B / C est particulièrement intéressante car elle est hautement immunogène et constitue une cible puissante pour les lymphocytes T cytotoxiques<sup>118</sup>.

EBNA-3A et 3C sont importants pour la transformation des cellules B en LCL<sup>119,120</sup>.

En revanche, EBNA-3B est dispensable pour la transformation mais semble agir comme un gène suppresseur de tumeur en attirant les LT hôtes dans la tumeur<sup>121</sup>.

*c. La protéine membranaire latente 1 (LMP1)*

LMP1 est considérée comme la protéine clé du processus de transformation cellulaire induit par EBV<sup>122</sup>. LMP1 fonctionne comme un oncogène classique dans les modèles de fibroblastes de rongeurs<sup>123</sup>. LMP1 peut inhiber la différenciation cellulaire dans les cellules épithéliales<sup>124</sup>, peut provoquer une régulation négative du CD10 et une régulation à la hausse du CD11a, CD23, CD40 et CD54 dans les LB infectés par EBV<sup>125</sup>.

De plus, LMP1 ressemble fonctionnellement au CD40 et peut fournir à la fois des signaux de croissance et de survie aux cellules B. Le résultat de la signalisation LMP1-CD40 consiste à sauver les cellules B de l'apoptose et à stimuler leur prolifération. Cette homologie entre LMP1 et CD40 confirme l'hypothèse selon laquelle EBV, en imitant l'interaction CD40-CD40L, rend une cellule CG-B indépendante de l'aide des cellules T, favorisant ainsi la survie des LB<sup>126</sup>.

LMP1 active de nombreuses cascades de signalisation cellulaire dont :

- les voies canonique et non-canonique du facteur nucléaire Kappa B (NFkB) impliquées dans de multiples processus cellulaires dont l'apoptose<sup>127</sup>,
- la voie de la protéine kinase activée par les agents mitogènes (MAPK) impliquée dans la médiation des réponses cellulaires aux stimuli externes<sup>128</sup>,
- la voie JAK/STAT (Janus Kinase / Signal Transducers and Activators of Transcription) impliquée dans la transduction des signaux provenant des récepteurs des cytokines et des facteurs de croissance<sup>129</sup> malgré un mécanisme encore mal expliqué<sup>130</sup>.

#### *d. Les protéines LMP2A et 2B*

Les protéines LMP2A et 2B partagent une structure similaire caractérisée par 12 domaines transmembranaires avec une queue cytoplasmique C-terminale.

LMP2A présente une partie cytoplasmique N-terminale qui comprend 8 résidus de tyrosine dont deux forment un immuno-récepteur à motif d'activation à base de tyrosine (ITAM). Ces séquences ITAM se retrouvent dans les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du récepteur des cellules B (BCR). LMP2A et le BCR peuvent s'associer à la protéine kinase Lyn et la phosphorylation de l'ITAM par Lyn conduit au recrutement de la tyrosine kinase Syk et à l'activation de la voie canonique du BCR. Le principal résultat de cette cascade est la délivrance de signaux de survie aux cellules B<sup>131</sup>.

Dans le contexte de la colonisation des LB au cours de l'infection primaire *in vivo*, LMP1 (imitant l'interaction CD40-CD40L) et LMP2A (imitant le BCR) ont le potentiel de fournir les signaux nécessaires (indépendamment de l'aide des cellules T et de la liaison à l'antigène) pour permettre aux cellules infectées de manière latente de survivre et de se différencier en cellules mémoire.

LMP2A et 2B co-localisent dans les LB. LMP2B diminue les effets de LMP2A en altérant la phosphorylation de son extrémité N-terminale, empêche ainsi son effet sur la signalisation du BCR<sup>132</sup> et facilite le passage au cycle lytique<sup>133</sup>.

Il semble que LMP2B ne joue pas un rôle important dans la croissance à long terme des cellules B infectées par EBV et n'a aucun rôle majeur dans leur activation, leur prolifération ou leur survie aux stades précoces de l'infection virale<sup>134</sup>.

Dans les cellules épithéliales, LMP2A et 2B semblent avoir des rôles similaires. Elles peuvent augmenter la propagation et la motilité de ces cellules<sup>135</sup>. Elles sont également impliquées dans la limitation de la réponse des cellules épithéliales aux interférons  $\alpha$  et  $\gamma$  en augmentant le renouvellement de leurs récepteurs<sup>136</sup>.

#### *e. EBER*

EBER1 et EBER2 codent pour des ARN courts structuraux non codants exprimés au cours de toutes les formes de latence. Les transcrits EBER sont les produits de gènes viraux les plus fortement exprimés dans les cellules transformées par EBV. Cette abondance se révèle particulièrement utile pour la détection d'EBV dans des échantillons de tissus par hybridation *in situ*. Cette détection permet de visualiser de manière sensible et très spécifique les cellules infectées par EBV dans les tissus fixes et frais.

La fonction des EBER dans les cellules B reste assez énigmatique. Certaines données suggèrent que l'expression de l'EBER peut favoriser la résistance virale au travers de l'inhibition de la kinase activée par les ARN double brin (PKR) qui est impliquée dans les effets antiviraux des interférons<sup>137</sup>.

De plus, les EBER ont été impliqués dans l'induction de l'expression de l'IL-10 dans le lymphome de Burkitt<sup>138</sup> et de l'IL-9 dans les cellules T infectées par EBV<sup>139</sup>. Ces ARN structuraux sont capables de s'associer à des protéines cellulaires, comme la protéine La<sup>140</sup>. Cette protéine est présente dans les exosomes produits par les cellules épithéliales, ce qui suggère que les EBER peuvent être activement sécrétés en combinaison avec la protéine<sup>141</sup>.

## VIII. Les pathologies associées à EBV

EBV peut globalement être considéré comme un virus bénin et faiblement pathogène. En effet, si l'on considère que près de 95 % de la population adulte est infectée et porte en permanence le virus, il est une évidence épidémiologique de conclure que la majorité des individus reste en bonne santé malgré le virus.

Cependant, il est aussi une évidence de constater que l'EBV est un puissant virus oncogène, dans la mesure où 100% des infections de LB humains réalisées in vitro conduisent à l'établissement de lignées transformées.

L'élément clé qui permet d'expliquer ce paradoxe est que la réponse immunitaire adaptative contrôle efficacement la réplication du virus dans l'organisme. L'élimination efficace des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques permet de maintenir un équilibre hôte/pathogène qui assure à la fois la propagation naturelle du virus et la bonne santé de son hôte. En effet, on observe en cas de défaillances immunitaires fortes (type immunodépressions) ou partielles, la survenue de cancers EBV chez les individus.

Par ailleurs, il apparaît que l'EBV est activé et fréquemment détecté au sein de lésions inflammatoires chroniques comme les maladies auto-immunes. Cette implication du virus dans les mécanismes inflammatoires ouvre un champ nouveau d'investigations concernant la pathogénie EBV et concerne très directement nos travaux.

Dans cette partie, la description des pathologies orales ou auto-immunes associées à EBV sera principalement approfondie.

### 1. La mononucléose infectieuse (MNI)

Encore appelée « maladie du baiser » ou « fièvre spléno-ganglionnaire », la mononucléose infectieuse (MNI) est la manifestation clinique symptomatique qui caractérise la primo-infection EBV. La MNI est principalement observée chez les adolescents encore EBV-séronégatifs.

Son association avec EBV a été découverte fortuitement chez une technicienne, connue comme préalablement séronégative pour EBV, travaillant dans un groupe de recherche sur ce virus qui a présenté les signes et contracté la MNI après une exposition au virus<sup>19</sup>.

La MNI est généralement une maladie spontanément résolutive après quelques semaines.

Ses symptômes se caractérisent par une pharyngite, de la fièvre, une grande fatigue, une adénopathie cervicale et une hépatosplénomégalie. Dans de rares cas, la sévérité de la MNI peut être confondue avec un syndrome hépatique (élévation des transaminases) et peuvent durer de 2 semaines à plusieurs mois.

L'apparition des signes cliniques s'accompagne d'un haut titre viral, de la production d'IgM dirigées contre les protéines de la capsid virale et d'une expansion massive de LT CD8+ circulants spécifiques d'EBV.

La quantité brute de CD8+ est 35 à 300 fois plus importante dans le cas d'une MNI que lors d'une infection asymptomatique.

Environ 50% de ces LT CD8+ sont spécifiques pour des protéines virales<sup>142</sup>.

Lorsque l'infection primaire survient au cœur de la petite enfance, la symptomatologie de la MNI est très faible, sans doute liée à l'état de tolérance immunitaire du tout jeune enfant.

Cependant, lorsque l'infection primaire survient à l'adolescence, il existe un risque de 25 à 70% de développer une MNI. Cependant, l'infection primaire à l'adolescence peut aussi être asymptomatique et les mécanismes qui déterminent ou pas le développement de la MNI sont encore ignorés.

Un facteur génétique a été mis en évidence dans la survenue de la MNI. En effet, des polymorphismes des gènes HLA de classe I ont été associés à un risque accru de MNI<sup>143</sup> et mis en corrélation avec la gravité de la maladie<sup>144</sup>.

Par ailleurs, il a été suggéré que le développement de la MNI pourrait refléter une capacité plus faible de l'individu à contrôler le virus<sup>145</sup>.

Cette influence génétique a été mise en évidence dans des études entre jumeaux. Elles ont montré une concordance accrue de la MNI chez des jumeaux monozygotes versus des dizygotes<sup>146,147</sup>.

## 2. Cancers associés à EBV

EBV a été le premier virus oncogène humain à être découvert. Il favorise la formation de lymphomes et de carcinomes. Il est estimé que l'EBV est responsable de plus de  $2.10^5$  cas de cancer chaque année et que 1,8% de tous les décès par cancer sont dus à des tumeurs malignes attribuables à EBV<sup>148,149</sup>.

Le sujet EBV et cancer est très vaste et constitue une part importante de la littérature sur le virus depuis sa découverte en 1964<sup>150</sup>. Nous nous exposerons ci-dessous les principales formes de cancers associés à EBV assortis de quelques commentaires.

Les protéines latentes d'EBV, notamment (LMP1, LMP2) peuvent contrôler la prolifération des LB en interagissant avec les principales voies de signalisation cellulaire. Cette activité régulatrice peut donc jouer un rôle causal dans le développement de tumeurs de type lymphome.

Les données épidémiologiques, sérologiques et biologiques moléculaires convaincantes associent l'infection EBV au lymphome de Hodgkin et au lymphome de Burkitt<sup>86</sup>.

Le HL est une tumeur des cellules du centre germinatif et les cellules tumorales infectées par EBV sont caractérisées par l'expression de EBNA1 et de LMP-1 et -2 correspondant à une latence de type II. Les cellules du HL sont bien adaptées pour échapper à la reconnaissance des LT CD8+ cytotoxiques car elles ont une expression régulée à la baisse du MHC-I.

Le BL est caractérisé par l'expression d'une seule protéine virale, EBNA1 dont le phénotype suggère une origine du centre germinatif et une latence de type I.

Si EBV est associé à ces lymphomes, seuls 30% des HL classiques et 30% à 40% des BL non endémiques relatifs au VIH sont infectés par le virus. Par contre 100% des BL endémiques et 100% des HL relatifs au VIH sont infectés par EBV<sup>144</sup>.

Chez les patients transplantés on observe en post-greffe une multiplication de cellules infectées par EBV (notamment si le patient était séronégatif pour EBV lors de la greffe). Dans cette situation, les patients présentent des hyperproliférations malignes de latence de type III dans lesquelles les cellules B expriment le spectre complet des protéines de latence du virus.

Il s'agit principalement des syndromes lympho-prolifératifs post-transplantations (SLPT) qui sont dans 80 à 90 % des cas des lymphoproliférations poly-clonales ou monoclonales de LB infectés par EBV<sup>103</sup>. Les SLPT associés à EBV concernent à la fois les greffes de cellules souches hématopoïétiques et les greffes d'organes solides. L'immunosuppression thérapeutique nécessaire à ces greffes entraîne une diminution de la surveillance T cytotoxique contre les LB infectés par EBV, avec pour conséquence une augmentation du nombre de LB infectés dans l'organisme et une augmentation du nombre de particules virales dans l'oropharynx.

EBV peut également établir des tumeurs malignes dans un environnement autre que dans des LB comme par exemple les cellules épithéliales dans les cas du carcinome du nasopharynx (NPC) et carcinome gastrique (GC).

Près de 100% des NPC<sup>22,151</sup> et seulement 5 à 15% des GC sont associés à EBV<sup>25,26</sup>.

L'association mécanistique d'EBV dans ces tumeurs malignes reste incertaine, bien qu'il soit supposé que ces carcinomes se développent en raison de l'établissement d'une latence virale de type I/II (EBNA-1 et LMP-2) dans les cellules épithéliales qui contiennent des modifications génétiques précancéreuses<sup>86,144,152</sup>.

### 3. La leucoplasie orale chevelue

La leucoplasie orale chevelue est une lésion épithéliale induite par EBV qui survient chez les patients immunodéprimés et particulièrement ceux atteints par le VIH<sup>153</sup>.

La pathologie siège sur les bords de la langue, sous la forme de lésions leucoplasiques en stries verticales blanches asymptomatiques, mal limitées et irrégulières.

Son histopathologie inclut une hyperparakérose épithéliale, une acanthose avec des cellules en ballon dans les couches spineuses et granuleuses et une réaction inflammatoire faible<sup>154</sup>.

Il faut réaliser un diagnostic différentiel avec d'autres pathologies dont le lichen plan oral, les leucoplasies tabagique ou idiopathique, les kératoses frictionnelles et les candidoses hyperplasiques chroniques.

Le diagnostic positif d'une leucoplasie orale chevelue est basé sur la présence d'EBV dans la lésion<sup>155</sup> et EBV est considéré comme l'agent étiologique de la pathologie<sup>156</sup>.

La pathologie est caractérisée par l'infection lytique par l'EBV des couches superficielles de cellules épithéliales de la langue. Ces cellules subissent une différenciation terminale, une apoptose et desquament, suggérant que la réplication *in vivo* d'EBV est dépendante du stade de différenciation de la cellule épithéliale<sup>157</sup>. Il s'agit là d'un modèle très intéressant dans la mesure où il illustre parfaitement la capacité d'EBV à accomplir un cycle lytique *in vivo* dans la cellule épithéliale. La leucoplasie ne nécessite que rarement un traitement spécifique toutefois le recours à l'acyclovir et au valacyclovir (inhibiteur de la polymérase virale) bloque la propagation épithéliale du virus et entraîne la disparition des lésions. Cependant, la thérapie est non curative car la réapparition des lésions est observée dès l'arrêt du traitement<sup>158</sup>.

#### 4. Les maladies auto-immunes

EBV présente de nombreuses caractéristiques qui suggèrent indirectement son implication dans la pathogenèse des maladies auto-immunes :

- EBV est ubiquitaire et les maladies auto-immunes ont une prévalence mondiale,
- EBV a une persistance à vie chez l'hôte humain avec des réactivations sporadiques et les maladies auto-immunes ont une évolution chronique avec alternance de périodes actives,
- EBV altère la réponse immunitaire, notamment au travers de la multiplication des lymphocytes B et la génération de PC producteurs d'anticorps. Dans le cas de l'arthrite rhumatoïde, il a été mis en évidence une charge virale en EBV plus élevée dans le sang périphérique, associée à une réponse immunitaire humorale exagérée contre EBV chez les patients auto-immuns, que chez les individus en bonne santé<sup>159</sup>,
- Plusieurs protéines EBV contiennent des motifs semblables à des peptides du soi (mimicry peptides), plusieurs exemples de ressemblance moléculaire entre les auto-antigènes les plus courants et les protéines EBV sont décrits<sup>160</sup>,
- par ailleurs, les patients atteints de maladies auto-immunes peuvent présenter une réponse cytotoxique anti-EBV altérée indiquant un manque de contrôle efficace de l'infection à EBV<sup>161,162</sup>,
- EBV a la capacité particulière d'inhiber l'apoptose, de limiter l'anergie, la tolérance immunitaire et d'induire la production de différentes cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 et l'IL-6. Ces processus sont potentiellement liés à la pathogenèse de plusieurs maladies auto-immunes<sup>163</sup>.

Malgré ces arguments, la discussion de l'implication d'EBV dans les maladies auto-immunes reste ouverte dans la mesure où les mécanismes par lesquels l'EBV pourrait contribuer au développement de telles maladies restent encore assez confus.

Les effets de l'infection à EBV dans l'auto-immunité pourraient relever du mimétisme moléculaire suggérant que l'auto-immunité pourrait être initiée par les antigènes EBV qui réagissent de manière croisée avec les protéines humaines<sup>164</sup>.

Une autre hypothèse est que l'EBV, en raison de sa capacité unique d'infecter, d'activer et de persister de manière latente dans les LB, permettrait la survie de clones auto-réactifs normalement appauvris à la périphérie par des mécanismes physiologiques tels que l'anergie<sup>165</sup>.

Il a également été proposé que la dysfonction des cellules T CD8+, caractéristique de nombreuses maladies auto-immunes, contribue au développement de l'auto-immunité chronique en altérant le contrôle de l'infection à EBV par les cellules T CD8+ avec pour conséquence l'accumulation de cellules auto-réactives infectées par EBV<sup>162</sup>.

Dans ce scénario, l'infection à EBV dans les lymphocytes B auto-réactifs soutiendrait le développement de follicules lymphoïdes ectopiques dans les organes cibles, une découverte fréquente dans les maladies auto-immunes systémiques. Dans ces organes cibles, les structures ectopiques constitueraient un site d'activation et de différenciation des LB auto-réactifs<sup>166</sup>.

Dans la littérature, EBV a été associé à différentes maladies auto-immunes à savoir la sclérose en plaques (SEP)<sup>167</sup>, le lupus érythémateux disséminé (LED)<sup>168</sup>, la polyarthrite rhumatoïde (PR)<sup>169</sup> et le syndrome de Sjögren (SS)<sup>170</sup>.

### a. EBV et sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est l'une des causes les plus courantes d'invalidité neurologique chez les jeunes adultes. C'est une maladie démyélinisante chronique du système nerveux central (SNC) caractérisée par des changements inflammatoires et dégénératifs dans le cerveau et la moelle épinière<sup>165</sup>.

La SEP affecte approximativement 2,5 millions de personnes à travers le monde<sup>171</sup> et elle est deux à trois fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes. Son incidence augmente généralement après l'âge de 18 ans et l'âge maximal au début est compris entre 25 et 35 ans<sup>172</sup>.

Les symptômes cliniques de la SEP sont constitués par des troubles sensoriels et visuels, des déficiences motrices, de la fatigue, des douleurs et des déficits cognitifs<sup>171</sup>.

Les examens pathologiques des cerveaux des patients atteints de SEP montrent des infiltrats inflammatoires péri-vasculaires, en particulier des lymphocytes T et des macrophages, ainsi qu'une dégradation de la myéline et une dégénérescence des axones<sup>173</sup>.

Il existe deux théories principales sur l'étiologie de la SEP. Le modèle traditionnel « extérieur » considère la SEP comme une maladie auto-immune dans laquelle les cellules T pénètrent dans le SNC et y détruisent divers éléments. Le résultat est une réaction inflammatoire qui entraîne une démyélinisation et des lésions tissulaires. La deuxième théorie est le modèle « à l'envers » dans lequel l'événement initial est une cyto-dégénérescence dans le SNC suivie par la libération de constituants antigéniques et l'activation de l'auto-immunité et de l'inflammation<sup>173</sup>.

La pathologie de la SEP est caractérisée par des zones démyélinisées confluentes dans la matière blanche et grise du cerveau et de la moelle épinière. Ces zones sont appelées plaques ou lésions et indiquent une perte des gaines de myéline et des oligodendrocytes. Bien que les axones et les neurones soient préservés de la SEP, la maladie en cours entraîne une perte neuro-axonale progressive conduisant à une atrophie cérébrale. Les astrocytes forment de multiples cicatrices gliales sclérosées dans les lésions de la substance blanche. Les zones démyélinisées de la substance blanche peuvent être partiellement réparées par re-myélinisation. La démyélinisation se retrouve également dans la substance grise du cortex, des noyaux et de la moelle épinière<sup>174</sup>.

L'inflammation est présente à tous les stades, mais elle est plus prononcée dans les phases aiguës que dans les phases chroniques. Les lésions précoces montrent une fuite de la barrière hémato-encéphalique et une invasion des cellules immunitaires périphériques. Les macrophages dominent l'infiltrat, suivis par les LT CD8+, alors que des nombres plus faibles de LT CD4+, de LB et de PC peuvent également être trouvés.

Au début de la maladie, il existe peu de dommages au cerveau et à la moelle épinière dans les zones extérieures aux lésions focales, appelées substance blanche d'apparence normale, bien qu'une atrophie cérébrale générale ait été notée<sup>175</sup>. Au fur et à mesure de l'évolution de la maladie, les infiltrats inflammatoires diffus des lymphocytes T et B, l'activation des microglies et des astrocytes, la réduction diffuse de la myéline et les lésions axonales sont évidents.

Il en résulte une atrophie plus prononcée de la matière grise et blanche<sup>174</sup>. Bien que la composition en lymphocytes T des infiltrats ne diffère pas avec l'évolution de la maladie, la proportion relative de lymphocytes B et de PC augmente<sup>176</sup>. La microglie et les macrophages restent dans un état d'activation chronique tout au long de la maladie<sup>177</sup>.

Finalement, l'inflammation s'organise à l'intérieur du système nerveux central, avec moins de cellules envahissantes observées dans les lésions au cours de la progression.

Dans la maladie progressive secondaire, des structures lymphoïdes tertiaires se sont formées dans les méninges, ces agrégats inflammatoires peuvent contribuer à la démyélinisation de la corticale et à la lésion tissulaire à des stades ultérieurs<sup>178</sup>.

Le lien entre EBV et SEP a été tout d'abord proposé pour expliquer la similitude entre l'épidémiologie de la mononucléose infectieuse (MNI) à celle de la SEP en termes d'âge, de répartition géographique, de statut socio-économique et d'appartenance ethnique.

Les deux maladies sont rares dans les pays en développement où la plupart des enfants sont infectés très tôt par le virus EBV sans développer de MNI. Au contraire, dans les pays occidentaux, où seulement 50% des individus sont infectés par EBV à l'adolescence et au début de l'âge adulte, le risque de SEP est deux à trois fois plus élevé chez les individus ayant des antécédents de MNI<sup>179</sup>. Cela suggère que l'infection EBV tardive pourrait jouer un rôle dans le développement de la SEP<sup>180</sup>.

Il est intéressant de noter que le risque pour les personnes séronégatives est environ 15 fois moins élevé que celui des individus infectés par EBV<sup>181</sup>.

Une étude cas-témoins, dans laquelle 100% des cas initialement négatifs sont devenus positifs à EBV avant l'apparition de la SEP alors que seulement 35,7% des témoins ont subi une séroconversion, suggère que l'EBV est une exigence pour le développement de la SEP<sup>182</sup>.

Ces observations supportent les faits que l'infection EBV est un facteur de risque important pour la SEP ou que les individus séronégatifs pour EBV sont génétiquement résistants à la fois à l'infection virale et à la SEP. Par ailleurs, une méta-analyse de l'association épidémiologique entre EBV et la SEP (sur 39 études menées entre 1960 et 2012) a mis en évidence une différence significative pour la séropositivité vis-à-vis des IgG anti-EBNA et anti-VCA dans les cas de SEP mais pas aux IgG anti-EA indicatrices d'une infection récente<sup>183</sup>.

Des études confirment également la corrélation positive entre les anticorps IgG anti-EBNA1 et l'activité de la maladie évaluée par IRM<sup>184</sup>.

En plus d'être détectés dans le sérum des patients avec une SEP, les anticorps anti-EBV sont détectés de façon élevée dans le liquide céphalorachidien de ces patients. Cela pourrait indiquer une synthèse spécifique d'anticorps contre EBV ou simplement refléter une synthèse d'anticorps polyspécifique<sup>185</sup>.

Enfin, des LT CD4+ spécifiques de EBNA-1 sont trouvés en proportion élevée dans le sang des patients atteints de SEP<sup>186</sup>. Une preuve indirecte de la présence du virus EBV dans le SNC est fournie par la découverte que les cellules T CD8+ spécifiques à EBV sont enrichies dans le SNC au début de la SEP, mais pas chez les patients présentant une autre maladie neurologique.

Par ailleurs, il a été démontré que le rituximab réduisant spécifiquement les LB CD20+ dans le sang périphérique et le liquide céphalo-rachidien (LCR) permettait une diminution du taux de rechute dans la SEP, ce qui pourrait être une autre preuve de l'association entre l'EBV et la SEP<sup>187</sup>.

Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer comment EBV pourrait jouer un rôle péjoratif au cours de la SEP :

### 1) Hypothèse des dommages occasionnés par EBV

Cette hypothèse est basée sur la notion que les dommages neurodégénératifs sont provoqués par des dommages causés par la réponse immunitaire anti-EBV. Dans les méninges de patients présentant une SEP, il a été mis en évidence de grands agrégats de lymphocytes B présentant des caractéristiques de follicules lymphoïdes B similaires aux centres germinatifs et la présence d'une infection EBV active dans ces agrégats<sup>188</sup>.

De même, des études montrent une présence plus élevée de LB infectés par EBV dans le tissu cérébral par rapport à d'autres maladies inflammatoires du SNC<sup>189,190</sup>.

Ainsi, l'infiltration de LB infectés par EBV induit l'activation des lymphocytes T (LT) CD8+ et/ou CD4+ spécifiques des antigènes d'EBV responsable d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire et des dommages aux tissus environnants<sup>191,192</sup>.

### 2) Hypothèse de la réactivité croisée d'EBV due au mimétisme moléculaire

Le mimétisme moléculaire est la définition donnée à la notion que des antigènes pathogènes structurellement similaires à des protéines de l'hôte, tels que la protéine de base de la myéline (MBP), induisent une réponse immunitaire croisée qui rend impossible la différenciation entre l'hôte et l'agent pathogène ciblé.

Ainsi, le mimétisme moléculaire entre EBV et les antigènes de la myéline suggère que les LT sensibilisés par exposition à des antigènes d'EBV réagissent de manière croisée avec les antigènes du SNC.

Dans ce contexte, il a été démontré que les antigènes EBV peuvent réagir avec des clones de LT réactifs à la MBP (85 à 99) prélevés sur des patients atteints de SEP<sup>193</sup>. Et cela est cohérent avec la détection de LT CD4+ EBNA-1 spécifiques réagissant avec les peptides MBP chez les patients atteints de SEP<sup>194</sup>.

Ce mécanisme n'explique pas le rôle unique d'EBV puisque tous les agents infectieux ont le potentiel de provoquer réactivité croisée avec le SNC mais sa capacité à provoquer une infection persistante tout au long de la vie et à produire EBNA-1 même au stade latent de l'infection, permet de proposer que l'EBV joue un rôle de premier plan dans la pathogenèse de la SEP<sup>185</sup>.

Plus récemment, le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) a été proposé comme un candidat plus probable que l'EBV pour la pathogénie SEP dans l'hypothèse d'un mécanisme basé sur le mimétisme moléculaire<sup>195</sup>.

### 3) Hypothèse de l' $\alpha$ B-cristalline

Cette théorie n'est pas nécessairement spécifique à EBV mais il est toujours candidat à ce mécanisme potentiel. Cette hypothèse postule que la tolérance immunitaire à la protéine de choc thermique  $\alpha$ B-cristalline ne se développe pas en raison de son expression limitée dans les tissus.

Par conséquent, quand elle est exprimée par les cellules lymphoïdes infiltrant le SNC suite à leur activation par des antigènes microbiens, une réponse des cellules T CD4<sup>+</sup> vis-à-vis de l' $\alpha$ B-cristalline présente dans les oligodendrocytes peuvent survenir et entraîner une démyélinisation inflammatoire.

EBV est un candidat potentiel car l'exposition des cellules lymphoïdes à EBV induit l'expression de  $\alpha$ B-cristalline et il est ainsi possible que le système immunitaire reconnaisse la protéine endogène comme un antigène microbien générant une réponse des LT CD4<sup>+</sup><sup>196</sup>.

À l'heure actuelle, il ne s'agit que d'une théorie car il n'y a pas de preuve claire à l'appui<sup>197</sup>.

### 4) Hypothèse des cellules auto-réactives infectées par EBV

Cette hypothèse propose que, chez des individus génétiquement prédisposés, il existe une déficience fonctionnelle des LT CD8<sup>+</sup> cytotoxiques qui maintiennent l'infection à EBV sous contrôle strict<sup>198</sup>.

Ainsi, les cellules CD4<sup>+</sup> auto-réactives survivent grâce aux LB infectés qui fournissent des signaux de survie co-stimulateurs empêchant l'apoptose. De cette manière, les lymphocytes T auto-réactifs sont alors capables de proliférer, de produire des cytokines, de recruter d'autres cellules et pourraient attaquer le SNC entraînant la propagation de la réponse immunitaire aux antigènes du SNC<sup>185</sup>.

Cette théorie a été testée en augmentant les LT CD8<sup>+</sup> réactives aux protéines latentes d'EBV chez un patient présentant une SEP et une atténuation des symptômes de la SEP a été constaté<sup>199</sup>.

De nombreux médicaments dont l'ocrelizumab<sup>176,200</sup>, l'ofatumumab et le rituximab<sup>201</sup> ou des traitements par interféron- $\beta$ <sup>202</sup> ont tous montré une réponse bénéfique associée à une réduction des lymphocytes B dans la SEP. Le nombre croissant d'agents monoclonaux ciblant l'épuisement de la population de LB avec une efficacité élevée dans la SEP ne fait que renforcer le rôle des LB dans la pathogenèse de la SEP. Cela signifie que l'identification des raisons de l'activité erronée des LB dans la SEP est susceptible d'être une clé majeure pour comprendre la cause de la SEP.

### 5) Hypothèse des cellules présentatrices d'antigènes infectées par EBV

Une infection par EBV confère des avantages de survie aux LB en imitant les signaux d'aide des LT et du récepteur des lymphocytes B mais elle induit également une modification des autres mécanismes biologiques des LB. Cette hypothèse propose que les LB infectés par EBV aient une expression différente des enzymes qui traitent les antigènes et les présentent aux LT d'une manière différente de celle des cellules non infectées<sup>203</sup>.

### *b. EBV et lupus érythémateux disséminé*

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune rare avec une incidence de 6 à 35 nouveaux cas pour 100 000 individus par an et se présente généralement chez les femmes (90% des cas) en âge de procréer<sup>204</sup>.

En 1997, l'American College of Rheumatology (ACR) a mis à jour les critères cliniques de classification du LED et indique que 4 critères sur les 11 définis doivent être présents de manière consécutive ou simultanée pendant une période d'observation afin de classer le LED<sup>205</sup>.

Les critères comprennent des symptômes dermatologiques (dont des éruptions cutanées et des ulcères buccaux), de l'arthrite, des troubles rénaux, des troubles neurologiques, des troubles hématologiques (dont une lymphocytopenie) et des troubles immunologiques.

Ces troubles immunologiques sont constitués par la présence d'anticorps anti-nucléaires (AAN) observés chez 80 à 90% des patients atteints de LED. Les plus courants sont les auto-anticorps dirigés contre l'ADN double brin (ADNdb) trouvés chez 58 à 70% des patients atteints de LED (Rahman 2008) mais il y a aussi des anticorps dirigés contre d'autres composants nucléaires tels que les histones dont les autoanticorps Ro52, Ro60, La et Sm<sup>206</sup>.

La présentation clinique du LED est influencée par divers facteurs, notamment l'ethnicité, le sexe, l'âge, les facteurs socioéconomiques et l'âge d'apparition<sup>207</sup>.

L'évolution typique de la maladie est illustrée par des périodes de poussées de maladie alternant avec une activité décroissante de la maladie. Le traitement typique du LED consiste en un traitement immunosuppresseur qui améliore cliniquement l'état du patient<sup>208</sup>.

Il a été mis en évidence que l'étiologie du LED est multifactorielle avec des facteurs (épi)-génétiques, environnementaux, hormonaux et immuno-régulateurs et que tous contribuent au développement de cette maladie très complexe<sup>209</sup>. Le LED est concordant chez 24% des jumeaux monozygotes et environ 2% des jumeaux dizygotes, ce qui indique une contribution génétique importante à son étiologie<sup>210</sup>.

Certains allèles de susceptibilité du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) II (HLA-DR2, HLA-DR3, HLA-DQ, HLA-DR) ont été identifiés et pourraient jouer un rôle dans le développement et être associés à la production des autoanticorps<sup>211</sup>.

Des gènes de la voie de signalisation des interférons (dont IRF5, STAT4 et SPP1) ont été associés à la pathogenèse du LED, ce qui reflète probablement les déficits immunitaires intrinsèques généraux des patients atteints de LED<sup>212,213</sup>.

Des carences de la voie du complément classique en C1q (93%) et en C4 (75%) sont un autre facteur de risque du LED. Le déficit en C1q peut être hérité mais aussi acquis du fait de la production d'autoanticorps C1q détectés chez les patients atteints de LED. Ces déficiences entraînent une diminution de la clairance des matériaux apoptotiques et à une accumulation de bulles apoptotiques. Les auto-antigènes nucléaires regroupés à la surface de ces bulles sont reconnus par le système immunitaire comme du « non-soi » et initient des réponses auto-immunes et la formation de complexes immuns circulants. Lorsque la concentration et la taille de ces complexes atteignent un niveau critique, ils peuvent se déposer dans le sous-endothélium et provoquer une inflammation et des lésions tissulaires<sup>214-216</sup>.

Au niveau immunitaire, une prolifération et une activité altérées des LT, un déséquilibre des cytokines T helper 1 / T helper 2, une réponse accrue des LT helper 17 ont été démontrés comme jouant un rôle dans la pathogenèse du LED<sup>217-219</sup>.

De même, des anomalies dans la signalisation et la fonctionnalité des cellules B ont été impliquées dans la pathogenèse du LED<sup>220</sup>.

Enfin, les polynucléaires neutrophiles sont également impliqués dans la pathogenèse du LED au travers du mécanisme d'action de la NETose. Ce phénomène physiologique piège et inactive les agents pathogènes par l'extrusion extracellulaire de leur chromatine et pourraient être à l'origine des auto-anticorps dirigés contre les antigènes nucléaires spécifiques du LED. La formation de pièges extracellulaires par les neutrophiles (NET) est fortement accrue dans le LED<sup>221,222</sup>.

L'apoptose, la nécrose et la NETosis expliquent comment des auto-antigènes normalement inaccessibles peuvent être libérés et ensuite exposés au système immunitaire.

Les auto-antigènes peuvent être modifiés lors de l'apoptose, facilitant éventuellement la violation de la tolérance. Ces anticorps sont produits par des cellules B auto-réactives (PC) et pourraient, avec des complexes immuns, des cellules T auto-réactives ou inflammatoires et des cytokines inflammatoires, initier et amplifier des lésions organiques.

Des facteurs environnementaux semblent également jouer un rôle sur sa pathogenèse au travers des modifications épigénétiques (dont l'hypo-méthylation de l'ADN) causées par l'exposition aux rayonnements ultraviolet et à certains produits chimiques ou médicaments<sup>223,224</sup>.

Enfin les infections sont connues pour être des facteurs environnementaux majeurs. De nombreux virus ont été évoqués dans le déclenchement du LED<sup>209</sup> et l'infection par EBV est fortement associée à son développement comme il est présenté ci-après.

L'implication d'EBV dans la genèse du LED est maintenant acquise et une dysrégulation de la réponse immunitaire spécifique de l'infection latente a été mise en évidence.

Des charges virales EBV plus élevées<sup>225</sup>, des niveaux d'expression accrus des ARNm EBV et une surproduction d'anticorps anti-EBV ont été rapportés chez les patients lupiques par rapport à des sujets sains<sup>44,226</sup>.

Par exemple, les taux d'anticorps dirigés contre l'antigène précoce diffus (EA/D) EBV sont significativement plus élevés chez les patients lupiques<sup>227</sup>. Ces résultats expliquent la tentative de l'hôte de contrôler l'infection lytique généralisée dans les LB et épithéliales essentiellement de manière humorale, par la production de différents isotypes d'anticorps IgM, IgA et IgG dirigés contre les antigènes du cycle lytique d'EBV.

L'implication de protéine de latence LMP1 a aussi été suggérée par des études effectuées sur des patients atteints de néphropathie lupique (NL). LMP1 exprimée sur les LB infectés par EBV stimule la voie CD40 et augmente ainsi leur capacité de présentation d'antigène et donc l'augmentation de la prolifération des lymphocytes T CD4+.

Une association entre NL et LMP-1 a été démontrée dans deux études. Une corrélation positive entre LMP1 et les EBER et la sévérité de la NL a été mise en évidence suggérant que l'infection rénale à EBV pourrait être directement impliquée dans le développement de la LN<sup>228,229</sup>.

LMP2A pourrait également jouer un rôle important dans le LED. En effet, dans un modèle murin, l'expression de LMP2A dans des lymphocytes B humains entraîne une hyperactivité et une différenciation des cellules B en PC produisant des anticorps de faible affinité dont notamment la production d'anticorps anti-ADNdb qui constitue une des principales caractéristiques des symptômes du LED<sup>230</sup>.

Des études antérieures ont démontré que les réponses des LT spécifiques d'EBV étaient altérées chez les patients atteints de LED<sup>231</sup>.

Une étude plus spécifique a étudié en détail ces réponses et a mis en évidence une diminution significative du nombre de LT CD8+ et CD4 + spécifiques de EBNA1 et EA/D chez des patients atteints de LED versus des patients sains. Il est observé une association inverse entre la réponse T EBV-spécifique et l'activité de la maladie. Comme l'immunité à médiation cellulaire est cruciale pour contrôler l'infection latente à EBV, ces résultats suggèrent qu'une perte du contrôle de l'infection EBV chez les patients atteints de LED avec un passage à des réactivations plus fréquentes et une réponse immunitaire humorale tentant de contrôler l'activité du EBV. Ce contrôle altéré d'EBV semble contribuer à l'exacerbation des symptômes du LED<sup>232</sup>.

### *c. EBV et polyarthrite rhumatoïde*

La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire systémique et chronique qui affecte principalement les grosses articulations. Le processus inflammatoire atteint la membrane synoviale, le cartilage et l'os ce qui conduit à la destruction de l'articulation. La PR est une pathologie auto-immune car elle est caractérisée par la présence d'auto-anticorps circulants dont le facteur rhumatoïde (FR)<sup>233</sup> ou les anticorps anti-protéines/peptides citrullinés (ACPA)<sup>234,235</sup>.

L'aspect clinique de la pathologie qui est fréquemment l'objet de débat ne sera pas traité. Toutefois on retrouve des aspects purement inflammatoires des articulations associés à des manifestations plus générales au niveau cardiaque, pulmonaire, hématologique, neurologique et de la peau.

La pathologie atteint les sujets préférentiellement entre 40 et 50 ans bien que la maladie puisse toucher les personnes de tout âge. L'incidence de la PR est généralement deux à trois fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes.

La PR est la forme de polyarthrite la plus répandue et touche entre 1 et 2% de la population adulte dans le monde. Mais sa prévalence varie selon les pays : son incidence est plus faible dans certaines parties de la Chine qu'en Europe occidentale et aux Etats-Unis<sup>236</sup> ce qui suggère une étiologie environnementale dans la pathogenèse de cette maladie.

Sa pathogenèse implique des interactions étroites entre une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux. La prédisposition familiale a été étudiée dans plusieurs études démontrant une transmission héréditaire de 65%<sup>237</sup>. L'association la plus élevée a été retrouvée avec la détection du loci HLA-DRB1<sup>238</sup> pouvant conduire à une présentation inappropriée de l'antigène aux LT<sup>239</sup>. De plus, la présence de l'HLA-DRB1 est fortement corrélée avec la présence d'ACPA<sup>240</sup>. Outre l'épitope partagé HLA-DRB1, d'autres polymorphismes d'un seul nucléotide (single-nucleotide polymorphism, SNP) dans des gènes candidats ont été liés à la PR comme les loci impliqués dans les interactions entre les LT et les cellules présentatrices d'antigènes (CTLA-4), dans la régulation du seuil d'activation des LT (PTPN22), du facteur de transcription STAT4 et de la chimiokine homéostatique CCL21<sup>241</sup> sans que leur relation ne semble être supérieure à 5% des cas rencontrés.

Plus intéressant, parmi les facteurs environnementaux, l'infection par des microorganismes intracellulaires dont les mycoplasmes<sup>242</sup> et mycobacterium tuberculosis<sup>243</sup> ou des virus dont le rétrovirus humain 5<sup>244</sup>, le virus de la rubéole, le parvovirus B19<sup>245</sup>, le cytomégalovirus<sup>246</sup> et EBV<sup>247</sup> a été évoquée comme facteur étiologique bien que toutes les études s'accordent sur le fait que la primo-infection ne s'accompagne pas systématiquement d'une PR.

Parmi ceux-ci, EBV a été l'un des plus étudiés et plusieurs hypothèses concernant son implication dans la PR ont été émises. Ainsi, la survenue de la PR est la résultante d'interactions complexes entre de multiples facteurs environnementaux survenant chez des individus génétiquement prédisposés.

Plusieurs hypothèses mécanistiques ont été proposées pour expliquer la contribution d'EBV à la pathogenèse de la PR est sont présentés ci-dessous.

### 1) Mimétisme moléculaire des antigènes EBV avec les protéines du soi

La réactivité croisée est supposée se produire entre les protéines virales et humaines. Plusieurs études mettent en évidence des similitudes moléculaires entre les antigènes EBV et les antigènes du soi.

La prédisposition à la PR est portée par les allèles HLA-DR contenant le motif QK/RRAA ou RRRAA dans leur troisième région hypervariable est appelé « épitope partagé »<sup>248</sup>. Il est intéressant de constater que le motif QKRAA située sur la molécule HLA-DRB1\*04:01 est également retrouvé dans la glycoprotéine gp110 d'EBV.

La gp110 est localisée dans l'enveloppe virale et les individus infectés par EBV ont des anticorps sériques dirigés contre gp110 et leurs LT reconnaissent les peptides contenant QKRAA<sup>249</sup>.

L'équipe de M.A. Alspaugh a montré que les sérums de patients atteints de PR étaient réactifs contre l'antigène nucléaire de la polyarthrite rhumatoïde (RANA)<sup>250</sup> et que les titres d'anticorps anti-EBV (dirigés contre des antigènes EBV latents et de réplication, tels que EBNA, VCA et EA) étaient plus élevés chez les patients atteints de PR que chez les patients témoins<sup>251,252</sup>.

Ultérieurement, RANA a été identifié comme une répétition riche en glycine/alanine également retrouvé dans EBNA1 et il a été mis en évidence que les anticorps dirigés contre RANA et EBNA-1 identifiaient le même polypeptide<sup>253</sup>.

À noter que l'infection antérieure par EBV ne semble pas être plus fréquente chez les patients atteints de PR que chez les patients témoins<sup>254</sup>.

De plus, ces séquences répétitives glycine-alanine sont également présentes dans les protéines du cytosquelette, comme la cytokératine et le collagène de type 2<sup>255</sup> et surtout une forme citrullinée d'EBNA-1 réagit de manière croisée avec des peptides du fibrinogène humain citrulliné<sup>256</sup>.

Également, il pourrait exister des homologies de séquence entre la protéine EBNA-6 et la séquence HLA-DQ\*0302<sup>257</sup>.

On observe également que l'EBV exprime une protéine similaire à l'interleukine 10 humaine (vIL-10) et un récepteur couplé aux protéines G qui présente une similitude de séquences avec CXCR4<sup>258</sup>.

Il est donc possible que le mimétisme moléculaire contribue à une rupture de tolérance et favorise l'auto-immunité chez les patients atteints de PR ou d'autres pathologies de type auto-immunes.

## 2) Diminution de la réponse immunitaire à médiation cellulaire contre EBV

L'aggravation de la PR semble être corrélée avec une perte d'efficacité de la réponse immunitaire à médiation cellulaire médiée par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> avec notamment la diminution des capacités de production d'IFN- $\gamma$  par ces cellules<sup>252,259,260</sup> et à une plus grande capacité des LB infectés par EBV à proliférer chez les patients atteints de PR par rapport à des sujets sains<sup>261</sup>). Le résultat de défauts fonctionnels dans le compartiment lymphocytaire T CD8<sup>+</sup> spécifiques d'EBV est un contrôle réduit de la prolifération des lymphocytes B induite par EBV<sup>262</sup>.

## 3) Réactivité inflammatoire anti-EBV au niveau de la membrane synoviale

Plusieurs études mettent en évidence la présence d'ADN EBV, des EBER et antigènes de la phase lytique dans les tissus synoviaux de patients atteints de PR, mais les données issues de ces études restent très variables<sup>54,263,264</sup>. Cependant, d'autres études ne détectent pas de marqueurs EBV dans le tissu synovial<sup>265,266</sup>.

La présence de cellules infectées par EBV et la production d'antigènes EBV dans les lésions pourraient être les cibles d'une activité immunitaire accrue, associée à une exacerbation des mécanismes inflammatoires intra-lésionnels.

Récemment, l'équipe de M. Bombardieri a montré que la membrane synoviale de 43 patients atteints de PR contient des cellules infectées par EBV. Tout particulièrement on observe une différenciation locale de lymphocytes B réactifs en PC producteurs d'auto-anticorps<sup>267</sup>.

Cette étude met en évidence une relation entre la présence de LB et de PC infectés par EBV et la présence de structures lymphoïdes ectopiques similaires à de pseudo-centres germinatifs intra-lésionnels<sup>267</sup>.

Par ailleurs, il a été mis en évidence que les LT CD8<sup>+</sup> impliqués dans la PR présentaient majoritairement une réactivité anti-EBV au niveau des articulations des patients<sup>268,269</sup>.

En effet, une prépondérance intra-articulaire des clones de LT CD8<sup>+</sup> spécifiques des protéines BZLF1 et BMLF1 a été mis en évidence par rapport aux LT CD8<sup>+</sup> du sang périphérique<sup>270</sup> et une migration préférentielle des LT CD8<sup>+</sup> anti-EBV vers les sites inflammatoires a été observé<sup>260,271</sup>.

## 4) Les anticorps anti-protéines citrullinées

Comme indiqué précédemment, les titres en anticorps anti-EBV sont significativement plus élevés chez les patients souffrant de PR<sup>251</sup>. Par ailleurs, les anticorps anti-protéines/peptides citrullinés (ACPA) sont une famille d'auto-anticorps spécialement associés à la PR. Il est décrit que les antigènes EBV peuvent subir une citrullination post-transcriptionnelle, notamment les antigènes nucléaires EBNA1 et EBNA2 dénommées VCP1 et VCP2, respectivement (viral citrullinated peptide-1 et -2).

Il a été démontré que VCP1 et VCP2 étaient reconnus par les sérums de patients avec PR et que les titres d'anticorps anti-VCP1 et VCP2 étaient corrélés avec les titres d'ACPA<sup>272</sup>.

De plus, la région des acides aminés 35 à 58 avec 6 répétitions glycy-arginyl de EBNA-1 citrulliné est un antigène cible des ACPA chez les patients atteints de PR<sup>273</sup>.

Les anticorps dirigés contre VCP1 et VCP2 apparaissent des années avant l'apparition des manifestations cliniques du RA et sont préférentiellement associés à la présence d'HLA-DRB1SE<sup>274</sup>.

Par ailleurs, des PC producteurs d'anti-ACPA infectés par EBV ont été au sein des structures ectopiques lymphoïdes<sup>267</sup>. Le mécanisme serait que les peptides citrullinés sont reconnus et activent les lymphocytes. Ces derniers produisent à leur tour des médiateurs pro-inflammatoires stimulant les cellules, causant des lésions articulaires et aident les PC à la production d'ACPA qui peuvent être pathogéniques.

#### *d. EBV et syndrome de Sjögren*

Le syndrome de Sjögren (SS) porte le nom de Henrik Sjögren qui, en 1933, a présenté les résultats cliniques et histologiques de 19 femmes présentant des symptômes de sécheresse oculaire et buccale<sup>275</sup>.

Le SS est une épithélite auto-immune<sup>276</sup> primaire (pSS) ou secondaire (sSS). La pSS affecte environ 0,1 à 0,4% de la population mondiale avec un pic de survenue entre 40 et 60ans et avec un biais important chez les femmes, ce qui se traduit par un ratio femmes / hommes d'environ 9/1<sup>277-279</sup>. La maladie a une prévalence qui varie non seulement dans différentes régions du monde, mais aussi dans le même pays ce qui laisse à penser que des facteurs directs, génétiques et environnementaux, jouent un rôle crucial dans sa pathogenèse<sup>280</sup>.

Le sSS présente un tableau plus complexe dans la mesure où la maladie est accompagnée d'une autre maladie auto-immune du tissu conjonctif telle que la PR, le LED ou la SEP<sup>281,282</sup>.

Le SS est une maladie auto-immune multi-organique systémique qui évolue de façon chronique ou progressive et qui se caractérise, entre autres, par un dysfonctionnement sécrétoire des glandes salivaires et lacrymales conduisant à des symptômes de sécheresse (ou sicca) oculaire et buccale<sup>283</sup>.

Dans cette pathologie, les principales cibles du processus inflammatoire sont les glandes exocrines (dont les glandes salivaires mineures et majeures et les glandes lacrymales)<sup>284</sup>.

L'élément causal susceptible d'induire la cascade inflammatoire auto-réactive dans ces organes n'a pas encore été identifié mais le processus enclenché aboutit à des lésions tissulaires sévères souvent associés à des mécanismes de mort cellulaire par apoptose<sup>285</sup>.

L'apoptose dans les cellules épithéliales des glandes salivaires a été proposée comme un mécanisme étiopathogénique potentiel associé à la déficience de la fonction glandulaire sécrétoire<sup>286</sup>.

L'importance de l'apoptose des cellules épithéliales dans la pathogenèse de SS est corroborée par les données obtenues d'un modèle expérimental chez la souris. Chez ces souris, la suppression de l'expression de l'inhibiteur de NF $\kappa$ B dans les cellules épithéliales de la glande lacrymale de l'œil a entraîné une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales et une lésion inflammatoire semblable à celle observée dans le cas du SS dans les glandes lacrymales.

Ces caractéristiques étaient associées à des titres élevés d'anticorps sériques anti-Ro/SSA et anti-La/SSB et pouvaient être inversées en traitant les souris avec des inhibiteurs des caspases bloquant l'apoptose<sup>287</sup>.

Jusqu'à présent, la plupart des études étaient concentrées sur le rôle des LT CD4+ dans la destruction des tissus<sup>288</sup>, en négligeant les dommages potentiels imputables aux lymphocytes B<sup>289</sup>. Il a été mis en évidence que les LT induisent l'apoptose des cellules épithéliales par la libération de protéases ou par l'interaction entre le ligand Fas à la surface des LT CD4+ activés et le récepteur Fas à la surface des cellules épithéliales cibles<sup>286,290</sup>. Plus récemment, il a été mis en évidence que les LB pouvaient être impliqués dans cette apoptose des cellules épithéliales, non pas au travers des interactions Fas/Fas-ligand, par la translocation de la protéine kinase C delta (PKC  $\delta$ ) dans le noyau des cellules épithéliales<sup>291</sup>.

Biologiquement, on retrouve un infiltrat glandulaire composé de cellules immunitaires associées à une production aberrante d'auto-anticorps. Ces auto-anticorps possèdent une valeur diagnostique et pronostique importante dans l'évaluation de l'activité de la maladie. Les auto-antigènes associés exprimés sur des bulles à la surface des cellules épithéliales apoptotiques des glandes exocrines provoquent une inflammation chronique et un dysfonctionnement des glandes ou épithélite auto-immune<sup>292</sup>.

La présence d'un grand nombre d'auto-anticorps (anti SSA/Ro de 52kDa, anti SSA/Ro de 60 kDa et anti SSB/LA) constitue un des critères spécifiques du diagnostic du SS<sup>281</sup>. Des anticorps antinucléaires sont présents dans les sérums de 80% des patients.

Parmi eux, deux anticorps ciblant les ribonucléoprotéines, l'antigène du syndrome de Sjögren A (Ro) et l'antigène du syndrome de Sjögren B (La) sont inclus dans les critères officiels de diagnostic du syndrome de Sjögren<sup>281,283,293</sup>. Cependant, ces deux auto-anticorps existent également dans d'autres maladies auto-immunes, telles que le LED.

D'autres auto-anticorps, dont les anti-annexines, pourraient servir de biomarqueurs des maladies auto-immunes. L'anticorps anti-annexine XI a été observé dans le SS<sup>294</sup>. De même, la protéine cytosquelettique  $\alpha$ -fodrine présente dans les cellules apoptotiques est un autre auto-antigène possible dans le pSS<sup>295</sup>.

L'étiologie du SS est encore mal connue, mais ce syndrome est considéré comme une maladie multifactorielle dans laquelle les facteurs génétiques, le sexe, les anomalies immunologiques, les facteurs environnementaux et la présence d'antigènes infectieux jouent des rôles importants<sup>284,296</sup>. Au niveau génétique, il a été mis en évidence que les patients atteints de pSS présentaient une fréquence plus élevée d'antigènes d'histocompatibilité sélectionnés dont l'haplotype HLA DRB1\*03-DQB1\*02 qui a été fortement associé à la production d'anticorps anti-Ro et anti-La chez des patients atteints de SS et de LED, suggérant un chevauchement du patrimoine génétique de ces deux maladies<sup>297,298</sup>. De plus, plusieurs polymorphismes de cytokines et de gènes pro-inflammatoires ont été suggérés pour jouer un rôle dans la pathogenèse du SS<sup>296,299</sup>.

Le pSS survient le plus souvent chez les femmes d'âge moyen. Certaines études ont suggéré que les hormones sexuelles et le chromosome X pourraient jouer un rôle dans son développement<sup>300,301</sup>.

Les facteurs environnementaux impliqués dans la pathogenèse du SS sont divers mais un contexte infectieux semble péjoratif. Si des études récentes indiquent que les bactéries intestinales commensales pourraient jouer un rôle dans le développement du pSS<sup>302</sup>, seul le rôle supposé d'EBV sera abordé dans cette étude.

La voie de l'interféron de type I (IFN-I) joue un rôle important dans le processus des maladies auto-immunes dont le SS<sup>303-306</sup>. L'induction de l'IFN-I propage une multitude de fonctions biologiques dont un rôle protecteur contre les infections virales et bactériennes, une immuno-modulation et l'anti-prolifération<sup>305</sup>. Les patients avec un pSS présentent une augmentation de l'expression de l'IFN- $\alpha$  dans les glandes salivaires labiales, le plasma et les cellules du sang périphérique<sup>303</sup>. Une surexpression des gènes inductibles par l'IFN-I a aussi été mise en évidence dans le sang périphérique et les glandes salivaires des patients<sup>303</sup>. Cette expression génique est positivement corrélée aux titres des auto-anticorps anti-Ro60/SSA et anti-LA/SSB<sup>304</sup>. Une régulation à la hausse des gènes contrôlés par l'IFN-I est associée à une maladie active<sup>307</sup>. Les principaux producteurs d'IFN-I sont les cellules dendritiques plasmacytoïdes qui produisent 1000 fois plus d'IFN- $\alpha/\beta$  que les autres types cellulaires<sup>308,309</sup>.

Certaines infections virales (la tuberculose, la lèpre, les spirochètes, l'hépatite A, B ou C, le parvovirus B19, la dengue, le paludisme, l'endocardite bactérienne subaiguë, le VIH) peuvent ressembler et constituer une maladie semblable au SS<sup>310</sup>.

De même, certains virus, dont la famille des *Herpesviridae*, présentant un tropisme vers les tissus glandulaires salivaires et lacrymaux peuvent être impliqués dans sa pathogenèse<sup>310</sup>.

On suppose donc qu'elles sont directement impliquées dans la pathogenèse et l'initiation de la SS mais d'autres infections virales semblent jouer un rôle plutôt protecteur<sup>311,312</sup>.

Enfin, plusieurs séries de preuves épidémiologiques, sérologiques et expérimentales impliquent des infections rétrovirales en tant que facteurs déclencheurs du développement de la SS<sup>313</sup>.

La suite du paragraphe se concentrera sur les associations en l'EBV et le SS et les mécanismes par lesquels EBV pourrait contribuer à la pathogenèse du SS.

Concernant le rôle supposé d'EBV dans le SS, au niveau systémique, il est intéressant de rapporter que les patients atteints de SS présentent un risque accru de développer des lymphomes associés à EBV. Environ 5% des patients atteints de SS développent un lymphome associé à EBV dans les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses des glandes salivaires<sup>314</sup>. Au niveau sérologique, plusieurs études rapportent des taux significativement supérieurs d'anticorps sériques anti-EBNA<sup>315</sup>, anti-VCA et anti-EA/D<sup>316,317</sup> chez les patients avec SS.

La détection de marqueurs EBV (ADN, ARN, antigènes, anticorps) dans la salive, les glandes salivaires, les glandes lacrymales, le sérum de patients atteints de SS a été rapportée dans de nombreux travaux. In vitro, la salive des patients SS présente la propriété de stimuler la réplication lytique d'EBV<sup>318</sup>. Cet effet activateur s'expliquerait par l'activation des récepteurs d'hydrocarbures aryliques (AhR), récepteurs cytosoliques normalement inactifs, activés par une diversité de ligands endogènes et exogènes. Dans cette étude, les données indiquent que l'EBV est fortement activé par la salive de patients atteints de SS en présence d'une activation exogène des AhR. De plus, la même étude a établi une corrélation entre l'anticorps anti-La (SSB) dans le sérum et l'action des AhR dans la salive de patients atteints de SS. On peut émettre l'hypothèse que la réactivation d'EBV peut être induite grâce à une activation exogène des AhR et être responsable de la réponse immunitaire dans les glandes salivaires des patients atteints de SS<sup>319</sup>. La stimulation de l'infection EBV pourrait contribuer à l'inflammation locale au travers notamment de la stimulation de cytokines (dont IFN-I) et promouvoir l'expansion de lymphocytes T auto-réactifs.

De manière analogue à ce que nous avons décrit dans le cas de la PR, le mimétisme moléculaire constitue un mécanisme probable par lequel EBV pourrait contribuer à la pathogenèse du SS. En effet, la majorité des sérums de patients atteints de SS reconnaît un seul peptide et ce peptide présente une homologie avec la protéine EA/D d'EBV, l'alpha-fodrine et la lipocaline lacrymale (une protéine hautement exprimée dans les larmes et la salive), ce qui fait de cette dernière un possible auto-antigène impliqué dans la pathogenèse du SS<sup>320</sup>. En effet, il a été démontré que la réactivation d'EBV pouvait augmenter l'activité d'une protéase clivant l'alpha-fodrine (une protéine du cytosquelette) dont le produit de clivage est considéré comme un auto-antigène important dans le SS. Ce produit de clivage est reconnu par les anticorps dirigés contre la protéine EA/D d'EBV<sup>321</sup>.

De même, il a été démontré que la protéine EBNA1 réagissait de manière croisée avec l'auto-antigène Ro (SSA) ce qui conduisait à la formation d'anticorps à réactivité croisée suivie par une perte de tolérance et du développement de l'auto-immunité<sup>317</sup>.

Par ailleurs, EBV a été détecté au stade lytique<sup>322</sup> ou latent<sup>323</sup> dans les cellules épithéliales des glandes salivaires mais aussi dans les LB des patients atteints de SS et de manière significative par rapport à des témoins sains. Des résultats similaires ont été rapportés dans les glandes lacrymales<sup>324</sup>.

De ce fait, un lien étiologique est suspecté entre EBV et le SS mais les preuves d'une expression préférentielle d'EBV dans les glandes salivaires de patients atteints du SS sont contradictoires.

Un récent article<sup>170</sup> suggère que l'explication pourrait être liée à la présence, ou pas, de structures lymphoïdes ectopiques (SLE) dans les glandes salivaires des patients atteints du SS. En effet, ces pseudo-structures lymphoïdes pourraient servir de niches pour la latence et la réactivation d'EBV dans des PC générés dans les SLE.

Dans cette étude, EBV a été détecté sous une forme latente (EBER, LMP2A) dans des lymphocytes B des follicules ectopiques ou une forme lytique (BFRF1) dans les PC périfolliculaires. De nombreux LT CD8+ cytotoxiques sont accumulés à l'extérieur des follicules des cellules B dans les zones riches en cellules BFRF1+.

Une forte réactivation d'EBV dans les PC CD138+ périfolliculaires produisant des anticorps anti-Ro52 (SSA) a été mise en évidence.

Il est à noter que les PC infectés par EBV semblent spécifiques de la pathologie dans la mesure où ils produisent des anticorps anti-Ro52 mais pas contre le fibrinogène citrulliné (antigène spécifique de la PR).

À l'inverse, les PC provenant du tissu synovial de patients atteints de PR interagissent avec le fibrinogène citrulliné mais pas avec Ro52. Ces résultats suggèrent donc que l'infection à EBV est étroitement associée à une réaction ectopique de type centre germinatif, bien qu'un lien de causalité entre le virus et le syndrome de Sjögren reste à déterminer<sup>170</sup>.

EBV pourrait être impliqué dans la pathogenèse du SS par le biais de déficiences immunitaires génétiques ou acquises. Il a été mis en évidence que des variantes de gènes impliquant les récepteurs muscariniques (CHRM3) sont spécifiques aux patients atteints de SS<sup>325</sup> et que des variantes de gènes communs impliqués dans les voies de cytokines (dont IRF5 et TNFSF4) contribuent vraisemblablement au développement de l'auto-immunité systémique<sup>326</sup>.

Les variations génétiques peuvent ainsi contribuer à des déficiences immunitaires et à un contrôle altéré de l'infection par EBV. Par conséquent, cela pourrait accroître le nombre de cellules infectées par EBV augmentant la production d'auto-anticorps et de déchets cellulaires induisant une accentuation de l'auto-inflammation dans les tissus.

En conclusion, la réactivation d'EBV et donc du nombre accru de cellules infectées par EBV entraînent vraisemblablement une amplification des quantités de déchets cellulaires. Cela stimulerait les cellules B auto-réactives et leur production d'auto-anticorps entraînant des poussées épidémiques.

À chaque réactivation, les quantités de molécules d'évasion immunitaire et d'anti-apoptose dues à EBV augmentent ce qui crée un cercle vicieux de l'activité de la maladie.

Cette interaction constante entre la réactivation d'EBV et la réponse immunitaire de l'hôte a probablement pour résultat un schéma de maladie spécifique à chaque patient avec des manifestations cliniques en fonction du patrimoine génétique, du site de réactivation ou de réinfection et du type de cellule infectée.

## Partie 2 : Le Lichen Plan Oral

### I. Historique

Le mot lichen a probablement été inventé par Théophraste au 4<sup>ème</sup> siècle avant JC pour décrire une croissance superficielle sur l'écorce des oliviers, mais ce n'est qu'au début du 17<sup>ème</sup> siècle que le terme a été réintroduit dans le domaine de la botanique.

Le terme « lichen plan » est dérivé du mot grec *leikhēn*, qui signifie « ce qui mange tout autour de lui » et du mot latin « *planus* » qui signifie « plat, niveau ».

Le dermatologue Sir William James Erasmus Wilson fut le premier à décrire et à nommer le lichen plan dans un contexte médical. Il caractérisa la maladie comme « une éruption de boutons remarquables par leur couleur, leur silhouette, leur structure, leurs habitudes de développement isolé et agrégé »<sup>327</sup>. L'éruption est faite de papules de quelques millimètres de diamètre, violettes, aplaties, fermes, sèches, très prurigineuses. La plaque formée est recouverte de stries quadrillées blanchâtres. Ces lésions siègent à la face antérieure du poignet, des bras, aux plis des coudes, sur les lombes et les organes génitaux externes, chevilles, dos du pied. Bien que Wilson ait enregistré la coexistence de lésions buccales chez certains de ses patients atteints de lichen plan, il fallut attendre 1885 pour voir publié le premier rapport clinique sur le lichen plan spécifiquement localisé dans la bouche, ou lichen plan oral (LPO)<sup>328</sup>.

Plus tard, Louis-Frédéric Wickham améliora la caractérisation des lésions en ajoutant « stries et punctuations grisâtres » aux caractéristiques décrites précédemment<sup>329</sup>.

Cette découverte remarquable, qui a plus tard reçu le nom de stries de Wickham, représente toujours la pierre angulaire du diagnostic clinique du lichen plan.

Enfin en 1906, William Dubreuilh fut le premier à décrire l'histopathologie d'une lésion de LPO<sup>330</sup>.

### II. Épidémiologie

Le LPO peut se présenter sous sa forme complète (atteinte conjointe de la peau et de la muqueuse buccale dans 50% des cas et apparaît sous une forme isolée (atteinte buccale uniquement) dans 25% des cas<sup>331</sup>.

Le LPO est considéré comme une des lésions de la muqueuse buccale les plus répandues dans la population adulte mondiale et présente une prévalence dans la population générale qui varie de 0,5 à 2,2%<sup>332,333</sup>.

La maladie apparaît principalement dans la population d'âge moyen, entre 30 et 60 ans, et présente une prédominance féminine de 2,3/1<sup>333,334</sup>. Elle touche plus rarement les enfants et les jeunes adultes<sup>335,336</sup>.

Malgré le grand nombre d'études menées pour déterminer la prévalence exacte des LPO dans la population générale, il semble y avoir un manque de données épidémiologiques valables<sup>333,337</sup>.

Le principal problème vient d'une absence de consensus pour le diagnostic du LPO et que d'autres réactions lichénoïdes orales peuvent être facilement diagnostiquées à tort comme des LPO. Cela suggère que la prévalence présentée dans un nombre significatif d'études est probablement exagérée.

Selon B.E. McCartan et C.M Healy, seule l'étude de T. Axéll et L. Rundquist incluant 20333 patients sur 15 ans donne des détails suffisants pour estimer la prévalence du LPO dans la population<sup>338,339</sup>.

Dans cette étude, elle est estimée à 1,9% dans la population générale (2,2% chez les femmes et 1,6% chez les hommes). La prévalence du LPO varie également en fonction du groupe ethnique et elle serait de 0,5% dans la population japonaise, 1,9% dans la population suédoise et 2,6% dans la population indienne<sup>340</sup>. Les populations caucasiennes seraient 5,5 fois plus susceptibles de développer un LPO que les autres groupes ethniques<sup>333</sup>.

Le taux de récupération d'un LPO est seulement d'environ 17% des personnes touchées<sup>341</sup>.

### **III. Localisation**

Le LPO peut affecter toutes les régions de la cavité buccale : la muqueuse jugale, la langue, la gencive, le palais, la demi-muqueuse labiale et enfin le plancher buccal<sup>342</sup>. La muqueuse jugale postéro-inférieure, avec une atteinte généralement bilatérale et symétrique le dos de la langue et la fibromuqueuse gingivale constituent les localisations les plus fréquentes<sup>343-345</sup>.

### **IV. Caractéristiques cliniques**

Le lichen plan est une maladie dermatologique chronique, pouvant durer toute la vie, pendant laquelle des périodes de rémission et d'exacerbation sont fréquemment observées. Elle affecte principalement la peau et les muqueuses buccales, mais peut également se manifester sur les lèvres, les ongles, le cuir chevelu, le gland du pénis et plusieurs autres muqueuses dont les muqueuses vulvaire et vaginale<sup>346</sup>.

Contrairement aux lésions cutanées qui guérissent le plus souvent spontanément en 1 à 2 ans, les lésions muqueuses ont une évolution prolongée sur plusieurs années<sup>347</sup>.

Dans son atteinte des muqueuses buccales, la maladie a tendance à être bilatérale<sup>340,348</sup>. En 1968, il a été décrit six formes cliniques de LPO, dont trois formes asymptomatiques (réticulée, papulaire et en plaque) et trois formes douloureuses (érosive, bulleuse et atrophique)<sup>349</sup>.

Cette classification est rapidement devenue secondaire car l'aspect clinique varie au cours de l'évolution et en fonction de l'activité du LPO.

En 1997, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a réduit cette classification à trois groupes différents (réticulé, érosif et atrophique) correspondant respectivement aux trois phases de développement du LPO à savoir, la phase initiale, la phase d'état et la phase tardive<sup>331,350</sup>.

Le LPO est une pathologie très débilitante pouvant avoir de graves conséquences sur la qualité de vie des patients<sup>351,352</sup>. Les patients se plaignent souvent de symptômes subjectifs, notamment une sensation de rugosité, des sensations de picotement et de brûlure, des démangeaisons et des douleurs. Bien que les formes érythémateuses et érosives soient généralement associées à des symptômes, tout type de LPO peut causer un inconfort aux patients. Le LPO est également associé avec la survenue de carcinomes et l'OMS a classé le LPO comme une lésion à potentiel malin<sup>353</sup>.

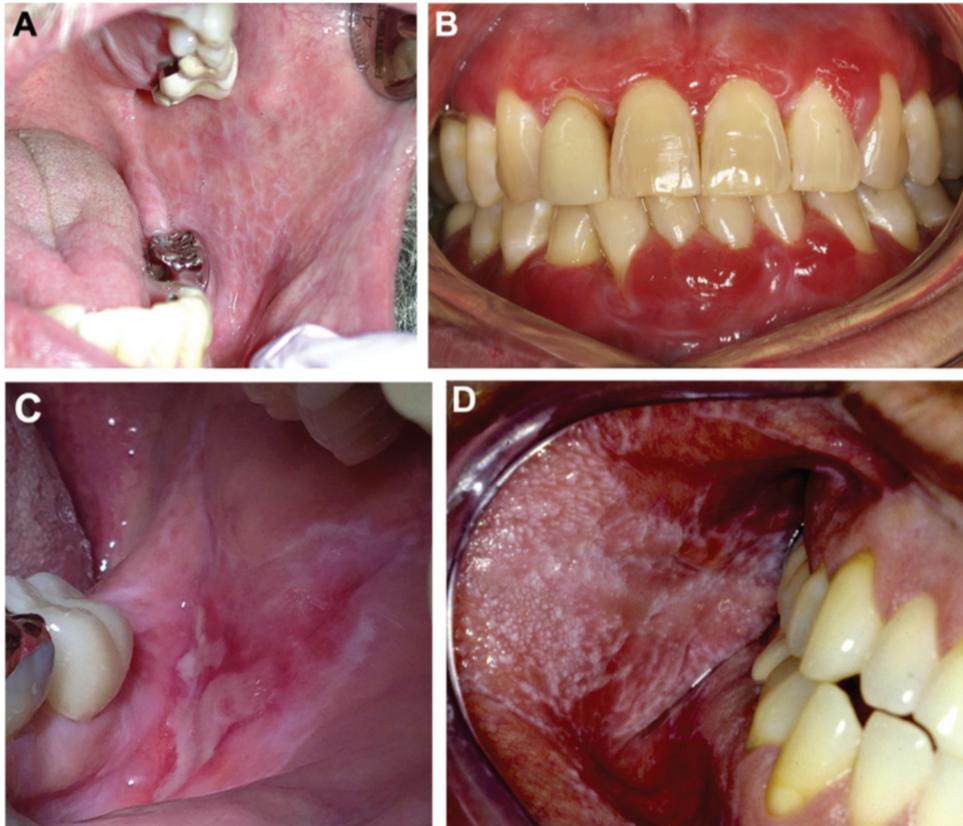


Figure 6: Caractéristiques cliniques des LPO<sup>354</sup>.

La Figure 6 présente (A) un LPO réticulaire, (B) atrophique (C) érosif et (D) papulaire. LPO, lichen plan oral.

### 1. La phase initiale

Cette phase dure entre six et douze mois et la lésion élémentaire est constituée par une papule. Ces lésions punctiformes kératosiques de couleur blanche vont peu à peu confluer pour former des stries fines appelées stries de Wickham souvent entourées d'une zone érythémateuse qui reflète une inflammation sous-épithéliale. Ces stries vont progressivement se réunir pour constituer un réseau (LPO réticulé) et donnent naissance progressivement en s'étendant à différentes figures (lésions dendritiques, circinées ...) ou à des plages kératosiques<sup>331,355,356</sup>.

Ces formes ressemblent à celles retrouvées au cours de la phase d'état en période de quiescence mais la persistance de quelques éléments punctiformes permet d'affirmer que le LPO est encore dans sa phase initiale.

### 2. La phase d'état

Cette phase présente une durée moyenne de dix ans et se caractérise par l'alternance de périodes de quiescence asymptomatique et d'activité symptomatique. C'est à cause et au cours de ces périodes d'activité que le patient va consulter et que le diagnostic du LPO, souvent passé inaperçu durant la phase initiale, est établi<sup>356</sup>.

Au cours de la phase d'état, plusieurs formes cliniques de LPO peuvent être observées :

- le LPO érythémateux est caractérisé par la présence d'un érythème entourant les stries ou localisé entre les mailles du réseau et à la périphérie des plages kératosiques,
- le LPO érosif, type de LPO le plus handicapant, est caractérisé par des érosions,
- le LPO hyperkératosique ou verruqueux défini par une extension des plages kératosiques préexistantes qui semble être une forme plus fréquente chez les fumeurs,
- Le LPO bulleux dans lesquels des bulles peuvent apparaître sur la muqueuse jugale postérieure lors de poussées d'activité importante<sup>356</sup>.

Le LPO érosif représente la forme la plus fréquente de la phase d'état car il représente 40% des LPO<sup>357</sup>. La forme érosive en activité apparaît cliniquement comme une ulcération centrale recouverte d'une pseudo-membrane ou d'une plaque de fibrine et est souvent entourée de fines stries kératinisées radiantées d'aspect en réseau. Ces lésions rouges sont de taille variable et de forme arrondie et apparaissent dans la région postérieure des joues, la face dorsale et les bords latéraux de la langue ainsi que sur la gencive attachée. Les érosions sont douloureuses et entravent la qualité de vie des patients<sup>331</sup>.

Au cours des périodes de quiescence asymptomatiques, le LPO érosif se présente sous la forme de lésions blanches kératosiques d'aspect clinique caractéristique (réticulé, annulaire, circiné, en tâches de bougie, en nappes) avec disparition des lésions d'érosion<sup>331</sup>.

La forme érosive du LPO correspond à un stade avancé et destructif de la maladie associé à plus de douleur et d'inconfort oral que les formes réticulaires blanches qui présentent généralement moins de symptômes<sup>358</sup>.

Pour ces différentes formes cliniques, pendant les périodes de quiescence, il n'y a pas de symptomatologie, ni d'érosion et les lésions kératosiques régressent sans disparaître totalement. Pendant les périodes d'activité, les signes fonctionnels sont variables : perception avec la langue d'un relief ou d'une perte de la souplesse, gênes et douleurs ou sensation de brûlures dépendant de l'importance de la poussée. Mais les poussées d'activité peuvent parfois être discrètes, quasi-asymptomatiques et passer inaperçues et dans ces cas, le LPO est souvent diagnostiqué à un stade avancé (LPB atrophique ou état post-lichénien).

### 3. La phase tardive

La phase tardive survient après plusieurs années d'évolution et parfois sans même que le LPO ait été diagnostiqué auparavant. Elle se traduit par l'apparition progressive d'un état atrophique ou scléro-atrophique qui apparaît principalement au niveau des régions de la muqueuse buccale (face interne des joues, de la langue et de la gencive) où il y a eu des lésions actives.

La muqueuse buccale atrophique a un aspect lisse, brillant et de couleur non uniforme. Elle est constituée de plages blanchâtres, jaunâtres, brunâtres ou rougeâtres, sans limites nettes. L'atrophie permet parfois de voir par transparence le réseau vasculaire sous-jacent<sup>356</sup>.

La forme atrophique a des répercussions fonctionnelles sur le patient car la sclérose associée peut, dans les formes sévères, entraîner une perte de l'élasticité de la muqueuse buccale, une limitation de l'ouverture buccale et une diminution de la protrusion de la langue.

Quelquefois, chez les sujets ayant la peau foncée, on voit apparaître des macules brun noirâtre qui prennent progressivement la place des anciennes lésions blanches. Cela définit le LPO nigricans que l'on observe à un stade avancé de la maladie. Il résulte de la stimulation de la mélanogénèse par l'inflammation chronique présente dans le LPO. L'évolution du LPO aboutit à un état cicatriciel irréversible (état post-lichénien) qui doit faire l'objet d'une attention rigoureuse et d'un suivi régulier car il peut être le siège d'une transformation maligne<sup>350,359</sup>.

#### 4. La transformation maligne

La complication potentielle la plus redoutable du LPO est la transformation maligne dont le premier cas a été rapporté en 1910<sup>360</sup>.

L'OMS inclut le LPO dans la liste des affections pré-cancéreuses mais le risque de cancérisation est faible (0,2 à 1%/an)<sup>361,362</sup>.

La dégénérescence survient dans les dix ans en moyenne après le diagnostic et le début du suivi des lésion<sup>363</sup>.

À l'heure actuelle, les patients atteints de LPO présentent un risque accru de développer un carcinome épidermoïde oral, non seulement au site d'une lésion de LPO préexistante, mais également dans tout autre endroit de la cavité buccale<sup>364,365</sup>.

Il semblerait que dans la forme réticulée classique le risque avoisinerait 0% alors que dans la forme érosive le risque serait majoré<sup>366</sup>.

Lo Muzio propose 3 hypothèses quant à la transformation maligne du LPO<sup>367</sup>:

- le LPO, état précancéreux, se transformerait spontanément en carcinome épidermoïde,
- la surface altérée de l'épithélium serait plus sensible aux carcinogènes (dont EBV),
- le carcinome épidermoïde se développerait fortuitement sur le même site que le LPO.

L'inflammation chronique semble constituer le facteur essentiel expliquant la transformation maligne du LPO<sup>368</sup>.

En effet, l'inflammation chronique et le renouvellement rapide des cellules épithéliales pourraient favoriser l'augmentation du nombre des mutations génétiques prédisposant ainsi au développement du carcinome épidermoïde<sup>369</sup>.

Par ailleurs, l'instabilité chromosomique liée à l'altération de la protéine p53 observée dans les LPO érosifs serait impliquée dans cette transformation<sup>370</sup>.

Toutefois quelques études mettent en évidence que le caractère transformant pourrait préférentiellement résulter de l'évolution de lésions lichénoïdes plutôt que de l'évolution d'un LPO<sup>371-373</sup>.

Enfin, le suivi continu des patients atteints de LPO, afin de réduire la morbidité et la mortalité par cancer de la cavité buccale, est recommandé<sup>374-376</sup>.

## V. Les maladies systémiques associées

Le LPO a été associé à un certain nombre de troubles, généralement d'origine auto-immune dont la colite ulcéreuse, le psoriasis<sup>377</sup>, la thyroïdite de Hashimoto<sup>378</sup>, la myasthénie, le thymome, la maladie coeliaque<sup>379</sup>, le diabète de type 1, le LED et le SS<sup>380,381</sup>.

L'association du LPO avec d'autres pathologies auto-immunes comme la PR ou le LED est encore peu étudiée. Concernant le SS, une étude multicentrique rétrospective a mis en évidence une prévalence plus importante du LPO chez les patients atteints<sup>381</sup>.

Enfin des études portant sur l'ensemble du génome ont identifié un grand nombre de loci majeurs impliqués en association dans diverses maladies auto-immunes dont le LPO<sup>382-384</sup>.

## VI. Traitement du LPO

En absence de certitudes concernant les mécanismes physiopathologiques à l'origine du LPO, les corticostéroïdes immunosuppresseurs sont utilisés comme traitement de première intention<sup>385,386</sup>. Un traitement immunosuppresseur topique ou systémique est généralement requis<sup>387,388</sup>.

Cependant, certains LPO se révèlent résistants aux corticostéroïdes en raison de la variabilité génétique et de la sensibilité des lymphocytes T aux molécules utilisées<sup>389</sup>.

Dans ces cas, d'autres options comme les inhibiteurs de la calcineurine, ciblant l'activation et la prolifération des lymphocytes T, ou les inhibiteurs des récepteurs de cytokines sont utilisés<sup>390,391</sup>. Malgré tout, le nombre de thérapies disponibles reste très limité<sup>392,393</sup>.

## VII. Caractéristiques histologiques

### 1. Rappels sur la structure histologique de la muqueuse buccale

La cavité buccale est bordée par une membrane muqueuse comprenant un épithélium malpighien (pavimenteux pluristratifié) ainsi que d'un tissu conjonctif sous-jacent appelé chorion et de la membrane basale séparant les deux structures précédentes. L'épithélium présente un degré de kératinisation variable selon le rôle de la muqueuse et il est constitué de deux types de cellules, les cellules kératinocytes et les cellules non kératinocytes. Cet épithélium est constitué de 4 couches distinctes (couche germinative, couche épineuse, couche granuleuse et couche superficielle) constituées de kératinocytes avec un degré de maturation variable. La couche superficielle est la couche où le processus de maturation est le plus avancé. Les cellules non kératinocytes sont constituées par les cellules de Langerhans, les cellules inflammatoires, les mélanocytes et les cellules de Merkel.

La membrane basale, structure épithélio-conjonctive séparant l'épithélium du chorion est composée par la lame basale (collagène de type IV) et la lamina fibroreticularis (collagènes III, IV, VII).

Le tissu conjonctif se compose de deux zones, une zone papillaire en surface et une couche réticulaire en profondeur. Cette structure est fortement innervée et très vascularisée et assure la défense de l'épithélium du fait de la présence de cellules immunitaires (lymphocytes, macrophages, PC)<sup>394,395</sup>.

## 2. Critères histologiques du lichen plan oral

L'histopathologie d'une lésion type LPO a été décrite pour la première fois en 1906<sup>330</sup>.

Le LPO se présente sous la forme d'une réaction tissulaire d'aspect lichénoïde caractérisée par un infiltrat inflammatoire intense de cellules mononuclées formant des bandes à l'interface épithélium-tissu conjonctif. Cet infiltrat est majoritairement constitué de lymphocytes T, de macrophages et de cellules dendritiques<sup>396</sup>.

En 1978, une triade caractéristique d'éléments histologiques associés à cette maladie fut décrite. Les éléments de cette triade sont :

- une parakératose ou une hyperkératose de surface (augmentation significative de la kératinisation),
- une dégénérescence avec liquéfaction de la couche germinative (stratum germinatum),
- un infiltrat inflammatoire en bande au niveau du chorion superficiel<sup>397</sup>.

D'un point de vue histo-pathologique, la lésion est considérée comme étant un LPO si la lésion inclut simultanément ces trois critères. En l'absence d'un de ces critères, la lésion est considérée comme « histologiquement compatible avec un LPO »<sup>398</sup>.

La présence de corps de Civatte, aussi appelés corps hyalin, correspondant à des kératinocytes apoptotiques éosinophiles<sup>399</sup> et l'aspect en « dents de scies » des crêtes épithéliales au sein des papilles conjonctives<sup>400,401</sup> sont aussi considérés comme d'autres caractéristiques histopathologiques.

À chaque stade d'évolution de la maladie correspond des altérations histologiques caractéristiques.

La phase initiale est caractérisée par une parakératose de surface, un épaissement ou un amincissement de l'épithélium et un effilochage des crêtes interpapillaires.

Pendant la phase d'état, il apparaît une ortho ou une parakératose de surface, des crêtes épithéliales avec un aspect en dents de scie, des papilles conjonctives en forme de dôme, quelques corps hyalins dans l'assise basale et un infiltrat inflammatoire en bande, à prédominance lymphocytaire, dans le chorion superficiel. Par ailleurs, les poussées d'activité sont marquées par une diminution de la kératose de surface, la présence d'érosions, une augmentation du nombre de corps hyalins et une augmentation de la densité de l'infiltrat inflammatoire.

Au cours de la phase tardive, la membrane basale devient rectiligne, l'épithélium s'amincit, la kératose prend parfois un aspect verruqueux, le chorion est le siège d'une fibrose collagène plus ou moins importante et l'infiltrat inflammatoire s'éclaircit.

Enfin, au cours des stades tardifs ou stades post-lichénien, l'activité du LPO est très faible voire éteinte. La muqueuse est devenue atrophique et l'infiltrat inflammatoire a disparu. L'atrophie épithéliale est accompagnée d'une hyperkératose de surface, d'une fibrose du chorion correspondant à un état cicatriciel et d'une éventuelle pigmentation. Ces altérations sont irréversibles<sup>350,402,403</sup>.

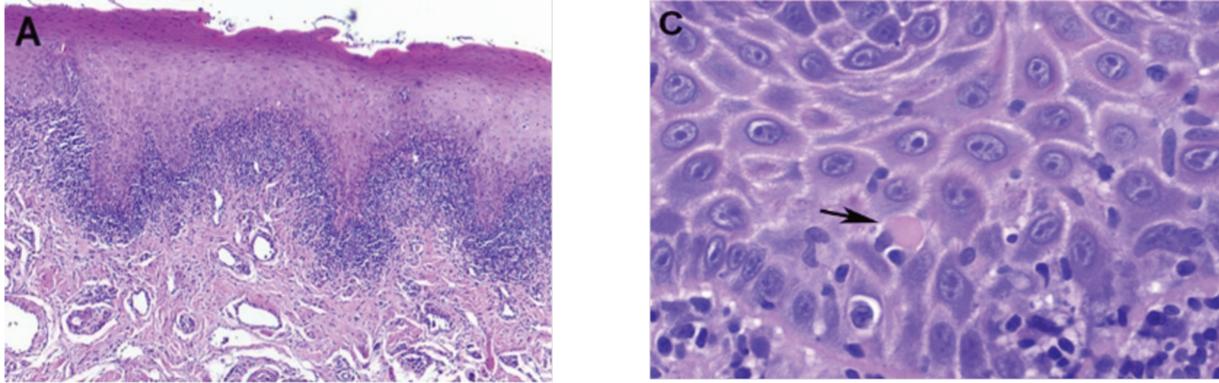


Figure 7 : Caractéristiques histopathologiques de la forme réticulaire d'OLP<sup>354</sup>.

(A) L'épithélium squameux stratifié de la muqueuse buccale présente une couche superficielle épaissie de parakératine, une morphologie en arête de rétine en dents de scie, une mince bande éosinophile adjacente à la couche de cellules basales et un infiltrat de cellules inflammatoires chroniques en forme de bande dense dans la lame superficielle propre (coloration H&E, grossissement initial x100). (C) Lésion médiée par les lymphocytes de l'épithélium squameux stratifié de la muqueuse buccale, avec apoptose des kératinocytes représentée par un corps colloïdal ou corps de Civatte (flèche) (coloration H&E, grossissement initial x400).

### VIII. Diagnostic du lichen plan oral

Le caractère bilatéral et la présence d'un réseau réticulé blanchâtre bien visible favorisent le diagnostic du LPO et dans ce cas l'examen clinique peut suffire.

Pour les autres formes, la recherche des stries de Wickham est impérative et leur présence est en faveur du LPO. La présence d'une atteinte cutanée peut aussi aider au diagnostic d'un LPO. De plus, la biopsie doit être envisagée pour les formes autres que celle du LPO réticulé et si le contexte clinique évoque une transformation maligne.

Enfin, l'immunofluorescence directe permet de déterminer la présence d'immunoglobulines ou de molécules du complément dans les sites lésionnels. Elle permet également de mettre en évidence le dépôt linéaire de fibrine et de fibrinogène au niveau de la membrane basale<sup>404</sup>.

Comme le LPO n'est pas associé à un dépôt d'anticorps ou de Complément, l'immunofluorescence directe ne constitue pas un examen de première intention. Par contre, elle est très utile dans les cas de LPO érosif car cet examen permet d'éliminer les autres diagnostics possibles, comme la pemphigoïde bulleuse, pemphigoïde cicatricielle, pemphigus vulgaire ou lupus érythémateux<sup>405</sup>.

### IX. Étiopathogénie

Bien que l'étiologie du lichen plan buccal ne soit pas tout à fait élucidée, dans la plupart des cas, il s'avère qu'un processus multifactoriel soit impliqué avec la participation de facteurs génétiques, environnementaux, psychologiques et infectieux.

#### 1. Les facteurs génétiques

La prédisposition génétique semble jouer un rôle dans la pathogénèse du lichen plan buccal du fait de l'existence de cas familiaux.

Deux études concluent que les facteurs génétiques associés aux HLA dont une fréquence significativement plus élevée de HLA-A3 contribuent dans une certaine mesure au développement du LPO<sup>406,407</sup>.

Toutefois, cette hypothèse est soumise à la controverse car une autre étude n'a pas démontré d'association significative entre un HLA particulier et un LPO familial<sup>408</sup>.

La cause immunogénétique n'a pas encore été établie mais plusieurs études rapportent de nombreuses associations d'HLA, notamment une augmentation de fréquence des HLA-A3, 5, 28, HLA-B5, 7, w57 et HLA-te22 et une diminution de fréquence de HLA-DQ1, DR4 et B18<sup>333</sup>.

Par ailleurs, plusieurs études suggèrent une relation possible entre le polymorphisme des gènes de certaines cytokines dont l'IL-4<sup>409</sup>, l'IL-6<sup>410</sup>, l'IL-8<sup>411</sup>, l'IL-10<sup>412</sup>, l'IL-18<sup>413</sup>, l'IFN- $\gamma$ <sup>414</sup> et le TNF- $\alpha$ <sup>415</sup>.

## 2. Les agents infectieux viraux

Les infections virales ont récemment été associées au lichen plan buccal et nos travaux récents concernent cet aspect<sup>416</sup>. Cependant peu de virus ont fait l'objet d'étude concernant l'étiopathogénie du LPO, notamment le virus de l'hépatite C (HCV), les papilloma virus humain (HPV) et les herpèsvirus dont le virus d'Epstein-Barr (EBV).

### a. *Le virus de l'hépatite C*

Le HCV est un virus à ARN enveloppé à tropisme essentiellement hépatique. Ce virus, capable de provoquer une infection chronique chez l'homme (1% des individus du monde occidental), est responsable de l'épidémie d'hépatite C dont une conséquence sévère concerne la survenue de carcinome hépatique. Le développement récent de molécules antivirales très efficaces permet de disposer aujourd'hui de traitements très efficaces pour lutter contre l'hépatite C.

À priori, il était peu probable de trouver une corrélation entre le LPO et HCV pourtant plusieurs études documentent ce point.

Le premier cas de LPO histologiquement confirmé chez un patient atteint d'hépatite C chronique fut rapporté en 1991<sup>417</sup>.

Une méta-analyse intégrant une quarantaine d'études a mis en évidence que l'association HCV-LPO était significative<sup>418</sup>.

De plus, il a été rapporté que la forme érosive de LPO était préférentiellement associée à l'infection HCV<sup>417</sup>. Cependant, des études plus récentes ont fait apparaître des variations significatives de l'association LPO-HCV selon l'âge et l'origine géographique des patients<sup>419</sup>.

En particulier, la présence de l'allèle HLA-DR6 serait en partie responsable des variations de l'association HCV-LPO selon les zones géographiques<sup>420</sup>.

D'autres études suggèrent que l'association HCV-LPO serait en fait la conséquence des médicaments utilisés pour le traitement de l'hépatite C, à savoir les IFN- $\alpha$ <sup>421-423</sup>.

### b. *Les papillomavirus humains*

Les HPV, notamment les types 16 et 18, sont responsables de cancers du col de l'utérus et de certains cancers oropharyngés. L'infection par HPV-16 a été associée au LPO selon l'observation que les lésions contenaient de manière significative des lymphocytes T CD8 spécifiques des antigènes viraux. De plus, la même étude met en évidence une augmentation préférentielle de la fréquence lymphocytes T spécifiques de HPV-16 dans les LPO érosifs<sup>424</sup>.

Cependant, l'association LPO et HPV-16 reste peu documentée et controversée. En effet, la présence des lymphocytes T anti-HPV ne démontre pas nécessairement une relation étiologique et cette relation peut être fortuite ou bien induite par les traitements immunosuppresseurs prescrit dans les cas de LPO symptomatiques<sup>425</sup>.

### *c. Le virus d'Epstein-Barr*

Il existe plusieurs évidences susceptibles de justifier que EBV puisse jouer un rôle dans le LPO :

- EBV est un pathogène commun qui présente un tropisme oral caractérisé par une forte fréquence salivaire et gingivale (cf. Introduction, Partie 3, IX.3.a.),
- EBV est fréquemment retrouvé dans divers types de lésions inflammatoires, notamment auto-immune (cf. Introduction, Partie 1, VIII.4.),
- EBV est impliqué dans la transformation des cellules épithéliales en carcinomes (i.e. carcinome du nasopharynx) et le LPO est considéré comme une lésion pré-cancéreuse qui peut se transformer dans de rares occasions en carcinome épidermoïde.

Malgré ces éléments, peu de travaux antérieurs ont permis d'étudier de manière approfondie les interrelations entre EBV et LPO.

Au moment de la publication de notre travail (cf. Résultats, Partie 1, I.), on identifiait dans « PubMed » seulement 18 articles sur ce thème, 9 y étant vraiment consacrés en mentionnant EBV and LPO dans le résumé.

De plus, les résultats de ces études sont difficiles à interpréter et, dans une certaine mesure, contradictoires.

En effet, comme cela est également discuté dans ce mémoire (cf. Introduction, Partie 3, X.1.), les méthodes utilisées pour détecter EBV sont susceptibles d'influer fortement sur la qualité des résultats obtenus.

La plupart des études utilisent la PCR dont le degré de sensibilité varie selon l'expertise des équipes, les types de PCR (PCR en temps réel, nested-PCR) et les méthodes d'extractions du matériel biologique (biopsies, buvardage, cytobrushing, grattage ...).

Une autre méthode pour identifier in-situ des cellules infectées par EBV dans des sections de tissus est la détection des EBER par hybridation in-situ grâce à des coffrets commerciaux standardisés qui est justement considérée comme la méthode « gold standard » (cf. Résultats, Partie 1, I.).

Des travaux pionniers avaient rapporté une aberration de la réponse humorale contre EBV chez les patients atteints de LPO avec un taux plus élevé d'anticorps anti-EA d'EBV (55%) comparé au groupe contrôle (23%)<sup>426</sup>.

Une étude antérieure avait aussi montré une surexpression du récepteur CD21 (récepteur d'EBV) au niveau des kératinocytes dans les LPO<sup>427</sup>. Ce qui à notre connaissance n'a pas été confirmé depuis.

Plusieurs travaux basés sur la détection EBV par PCR qualitatives, présentent des fréquences EBV dans le LPO variant de 26% à 62%<sup>428,429</sup>.

Dans l'étude de Vieira Rda et al. aucune différence significative n'a été trouvée avec le groupe contrôle. Il est à noter que la présence d'EBV est plus importante dans le groupe des lichens érosifs par rapport au groupe des lichens kératinisés sans que cette différence soit significative.

De plus, dans une étude, EBV a été détecté par immunohistochimie dans 35% des LPO ce qui était statistiquement significatif. Mais, cette étude n'a pas mis en évidence une corrélation significative entre la présence EBV et les caractéristiques histopathologiques, la localisation, le type clinique du LPO ou l'âge du patient<sup>430</sup>. À l'opposé, EBV n'a pas ou très faiblement été détecté par PCR dans des biopsies LPO<sup>431,432</sup>.

## X. Mécanismes physiopathologiques

La pathogénie exacte du LPO n'est toujours pas claire mais de nombreuses preuves appuient le rôle d'un dysfonctionnement du système immunitaire et rapprochent le LPO d'une maladie auto-immune<sup>347,387,433</sup>.

En particulier, le recours à des traitements inhibiteurs de l'activité cytotoxique des lymphocytes T (immunosuppresseurs) démontre que le blocage de la fonction T réduit significativement l'activité histologique du LPO, sans toutefois aboutir à une guérison définitive.

Dans ce contexte, Sugerman a proposé que des réponses immunitaires à médiation cellulaire spécifique d'antigènes ainsi que des mécanismes non spécifiques soient impliqués dans la pathogénèse. Il a supposé que d'autres mécanismes comme la réponse auto-immune humorale seraient également impliqués<sup>433</sup>.

### 1. Lyse des kératinocytes basaux par les lymphocytes T

Le LPO est identifié comme étant une maladie inflammatoire impliquant la réactivité LT. Il est établi que l'activité cytotoxique des LT provoque la destruction des kératinocytes épithéliaux<sup>408,433</sup>. Cependant la nature du ou des antigènes cibles des lymphocytes T reste une énigme. L'hypothèse selon laquelle ce processus impliquerait comme cibles des auto-peptides altérés ou des protéines de choc thermique est supportée par plusieurs études<sup>434,435</sup>.

La première étape débute par l'expression ou le démasquage des antigènes cibles dans les kératinocytes<sup>436,437</sup>.

Ensuite on observe :

- une migration des LT (principalement CD8 et de quelques CD4) vers l'épithélium,
- une activation directe (impliquant une liaison de l'antigène au CMH-I sur les kératinocytes) ou indirecte (impliquant une liaison de l'antigène au CMH-II présent sur les cellules présentatrices des antigènes) conduisant à une activation séquentielle des LT CD4 puis LT CD8 suivie de la libération de médiateurs (IL-2, IFN- $\gamma$ ),
- l'apoptose des kératinocytes basaux par les LT CD8 cytotoxiques<sup>433,437</sup>.

Le mécanisme exact de l'apoptose des kératinocytes basaux est expliqué par trois mécanismes :

- 1) le LT CD8 activé sécrète le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ) qui se lie au récepteur TNFR-1 à la surface des kératinocytes basaux,
- 2) les récepteurs FasL (CD95L) situés à la surface des cellules T se lient aux récepteurs Fas (CD95) de la membrane cellulaire des kératinocytes
- 3) le granzyme B sécrété par les cellules T pénètre dans les kératinocytes à travers les pores induits par la perforine dans leur membrane.

Tous ces mécanismes activent ensuite la cascade de signalisation des caspases conduisant à l'apoptose des kératinocytes<sup>433,438</sup>.

L'induction des auto-peptides ou la surexpression de protéines de choc thermique pourraient être liées à l'exposition à des agents exogènes, tels que les médicaments systémiques, les allergènes de contact, les traumatismes mécaniques, les infections bactériennes ou virales<sup>419,433,439</sup>.

Si l'hypothèse des auto-peptides du corps ou des protéines de choc thermique étaient confirmée cela renforcerait la notion que le LPO est en tout point semblable à une maladie auto-immune<sup>440</sup>, à savoir : la chronicité de la maladie, l'apparition préférentielle chez les adultes, la prédilection féminine, l'association avec d'autres maladies auto-immunes (diabète de type 1 et hépatite auto-immune), la diminution de l'activité suppressive chez les patients atteints de LPO, le développement de lésions dites «LPO-like» chez les patients atteints de la maladie du greffon contre l'hôte, l'amélioration ou la résolution des lésions après traitement immunosuppresseur et présence de clones de LT auto-cytotoxiques<sup>387,441,442</sup>.

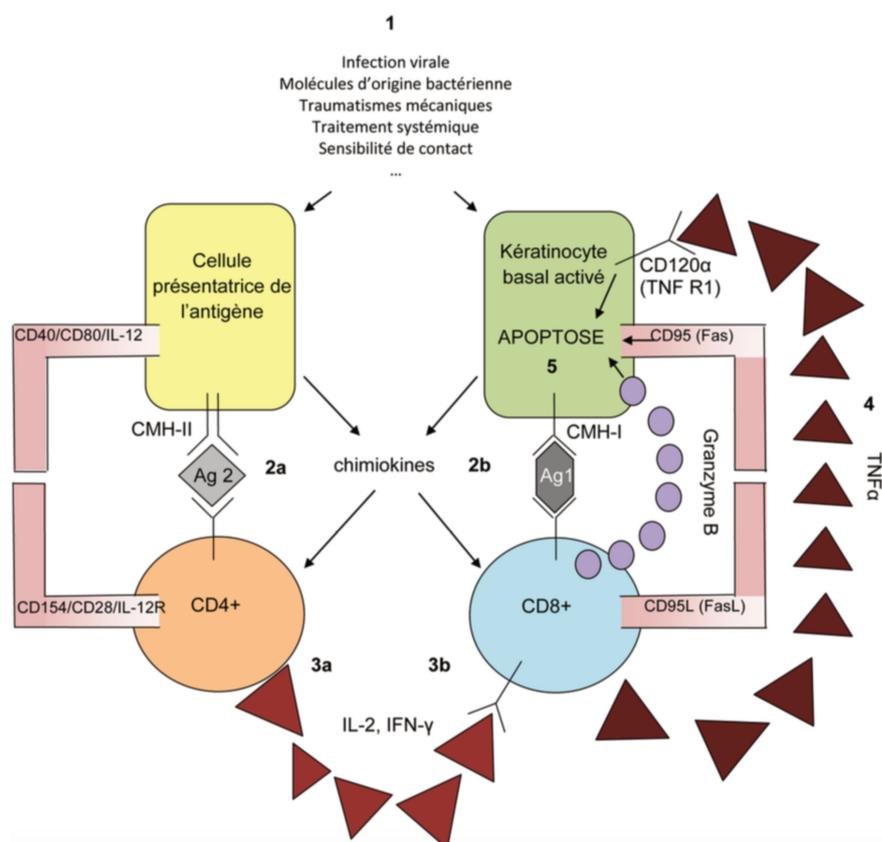


Figure 8 : Hypothèse pour l'immunopathogénèse du LPO<sup>356,387</sup>.

Les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et les kératinocytes basaux peuvent être activés par une infection virale, des molécules d'origine bactérienne, des traumatismes mécaniques, un traitement systémique, une sensibilité de contact ou un agent non identifié (1). Les CPA et les kératinocytes activés sécrètent des chimiokines qui attirent les lymphocytes. Les CPA activées présentent aux CD4 les antigènes associés au CMH de classe II (2a). Les kératinocytes de la couche basale activés présentent aux CD8 les antigènes associés au CMH de classe I (2b). La co-expression des CD4 et CD8 et la sécrétion d'IL-12 par les CPA du CMH de classe II entraîneraient une réponse cellulaire CD4. Les CD4 sécrèteraient de l'IL-2 et de l'INF-γ (3a) qui se fixeraient sur les T CD8 (3b). Les CD8 activés exprimeraient le FasL ou sécrèteraient de la granzyme B ou du TNF-α (4), responsables de la persistance de l'apoptose des kératinocytes (5).

## 2. Mécanismes non spécifiques

### a. Destruction de la membrane basale

L'altération de la membrane basale (dont la rupture, la ramification, la duplication ou l'épaississement) est fréquente au cours du LPO<sup>443</sup>. Elle pourrait être liée à l'apoptose des kératinocytes basaux qui participent au maintien de l'intégrité de la membrane basale par la production de laminine V et de collagène IV<sup>444</sup>. Inversement, les kératinocytes ont besoin du maintien de la membrane basale pour survivre et échapper à l'apoptose<sup>445</sup>. Les deux phénomènes pourraient donc agir de façon synergique et cyclique où l'apoptose des kératinocytes pourrait avoir été déclenchée par la rupture de la membrane basale et les kératinocytes apoptotiques pourraient ne pas être capables de la réparer.

### b. Les métalloprotéases matricielles

Les MMP sont des endoprotéases à zinc dont la fonction principale est la dégradation des protéines de la matrice du tissu conjonctif. Elles sont sécrétées et activées par les LT et leur activation dégrade la membrane basale et déclenche ainsi l'apoptose des kératinocytes<sup>433,446</sup>. La rupture de la membrane basale facilite le passage des LT CD8 entre les cellules épithéliales et favorise l'apoptose des kératinocytes<sup>447,448</sup>. Des taux plus élevés de MMP-1 et MMP-3 sont retrouvés dans le LPO érosif en comparaison avec le LPO réticulés ou chez les sujets sains<sup>449</sup>.

### c. Les mastocytes

La densité des mastocytes est élevée dans les LPO<sup>450</sup> où environ 60% des mastocytes sont dégranulés contre 20% dans la muqueuse buccale normale<sup>446</sup>. Cette dégranulation libère des médiateurs pro-inflammatoires dont le TNF- $\alpha$ . Celui-ci entraîne la surexpression de molécules qui facilitent l'adhésion des lymphocytes sur les parois vasculaires et la migration des cellules inflammatoires au site lésionnel<sup>387</sup>. Par ailleurs, des amas de mastocytes et de LT CD8 intra-épithéliaux ont été trouvés aux sites de rupture de la membrane basale suggérant que les mastocytes pourraient contribuer à la rupture de la membrane basale épithéliale<sup>446</sup>. Les mastocytes libèrent également des chymases et des tryptases qui activent des MMP (-1, -3 et -9) et contribuent de manière indirecte aux lésions de la membrane basale<sup>442</sup>.

### d. Les chimiokines

RANTES est une chimiokine qui joue un rôle important dans le recrutement des lymphocytes et des mastocytes. Il a été mis en évidence une expression élevée de RANTES et des récepteurs de chimiokines dans l'infiltrat inflammatoire du LPO<sup>449</sup>. Par ailleurs, RANTES favorise la dégranulation des mastocytes recrutés ce qui a pour conséquence d'augmenter la libération du TNF- $\alpha$  et donc la migration des LT au site lésionnel. De tels événements cycliques peuvent expliquer la chronicité de la pathologie<sup>442</sup>.

### e. L'immunité humorale

La présence d'anticorps circulants réagissant contre les Desmogléines 1 et 3 a été mis en évidence et suggère un rôle de l'immunité humorale dans la pathogenèse du LPO<sup>452</sup>.

## Partie 3 : La Parodontite

### I. Les maladies parodontales : définition et généralités

Les parodontites sont des maladies inflammatoires certainement multifactorielles, mais dont l'étiologie infectieuse peut être considérée comme majeure. C'est en 1965 que H. Loe apporta une preuve du rôle de la flore microbienne en réalisant des gingivites expérimentales chez l'homme<sup>453</sup>. L'abstention d'hygiène bucco-dentaire pendant 3 semaines chez des étudiants volontaires était associée à l'augmentation progressive de la quantité de la plaque bactérienne et tous les étudiants présentaient des signes cliniques de gingivite. La reprise de mesures d'hygiène fit disparaître la gingivite.

D'un stade initial réversible (la gingivite), la situation évolue vers une inflammation chronique appelée parodontite qui, au fur et à mesure des mois et des années (avec alternance d'épisodes inflammatoires aigus et de phases de latence) va conduire à la destruction irréversible des tissus parodontaux<sup>454</sup>.

Au cours des épisodes inflammatoires, la gencive est rouge, saigne et présente un œdème localisé. Une conséquence majeure et irréversible concerne la destruction des tissus parodontaux et notamment la perte de l'os alvéolaire qui soutient la dent.

La pathologie parodontale regroupe plusieurs maladies dont la classification actuelle est en vigueur depuis 1999<sup>455</sup>. Dans ces pathologies, on distingue principalement les lésions parodontales superficielles et réversibles, appelées gingivites et les lésions des tissus profonds de soutien de la dent (os alvéolaire, ligament alvéolo-dentaire, épithélium gingival) qui signent une parodontite.

La gingivite : C'est une pathologie réversible commune affectant tous les individus au moins une fois dans leur vie (prévalence de 80 à 100%). Elle correspond à une inflammation superficielle de la gencive papillaire et marginale initiée par une accumulation de plaque supra-gingivale<sup>456</sup>. Les signes cliniques principaux sont le saignement de la gencive pendant le brossage et la mastication, une rougeur et un œdème avec parfois une sensation de douleur. La gingivite est due à une hygiène bucco-dentaire insuffisante, aggravée par des facteurs locaux de rétention de plaque dentaire dont le tartre supra-gingival, des restaurations prothétiques ou dentaires mal adaptées et l'absence ou l'insuffisance de soins dentaires réguliers.

La parodontite : On distingue principalement deux types de lésions parodontales : les parodontites chroniques et les parodontites agressives. Une des caractéristiques principales concerne la formation d'une poche parodontale qui correspond à l'approfondissement pathologique du sillon gingival ou sulculaire (*Figures 9 & 12*) provoquée par la perte progressive de l'attache épithéliale de la gencive à la dent (cf. Introduction, Partie 3, IV.). L'attache épithélio-conjonctive du tissu gingival à la dent notamment l'épithélium jonctionnel, est dégradée et migre plus apicalement le long de la racine créant une poche parodontale autour de la dent atteinte (*Figure 9 & 12*).

Les parodontites chroniques : Ces maladies représentent la forme clinique la plus répandue dans le monde et apparaît généralement entre 30 et 40 ans. La prévalence et l'étendue des destructions parodontales augmentent avec l'âge et une hygiène inadaptée, on estime que 80 % de la population de plus de 30 ans présente un à cinq sites dentaires affectés<sup>457</sup>.

L'atteinte des tissus parodontaux est caractérisée par une inflammation gingivale visible ou non, des saignements gingivaux spontanés ou provoqués d'importance variable. Des épisodes douloureux, des abcès parodontaux, une mobilité dentaire et la migration de certaines dents sont parfois rencontrés. Cette forme clinique est associée à d'autres éléments locaux et notamment la présence de tartre supra et sous-gingival due à une hygiène bucco-dentaire perfectible.

Les parodontites chroniques peuvent être classifiées en fonction de leur étendue en parodontites localisées ( $\leq 30\%$  des sites atteints) ou généralisées ( $\geq 30\%$  des sites atteints) et sont également classifiées selon leur degré de sévérité défini par le niveau d'attache clinique (clinical attachment level ou CAL). Elles sont débutantes si  $1\text{mm} \leq \text{CAL} \leq 2\text{mm}$ , modérées si  $3\text{mm} \leq \text{CAL} \leq 4\text{mm}$  et sévères si le  $\text{CAL} \geq 5\text{mm}$ .

Les parodontites agressives : Elles représentent une entité spécifique moins répandue, qui affecte moins de 10% de la population générale. Cette forme clinique est prédominante chez les patients de moins de 30 ans et peut conduire à une perte des dents en quelques années<sup>458</sup>. Deux grandes classes de parodontites agressives sont décrites, la parodontite agressive localisée et la parodontite agressive généralisée. Dans ces pathologies, le sujet atteint est en bonne santé générale, la quantité de plaque bactérienne dans la cavité buccale est en inadéquation avec la sévérité de la destruction des tissus parodontaux et il est noté une présence importante d'anticorps sériques contre les agents infectieux.

## **II. Prévalence des parodontites**

En France, selon une enquête nationale réalisée sur 2144 sujets représentatifs âgés de 35 à 64 ans, 47% présentaient un CAL et une profondeur de la poche parodontale au sondage (PPS) supérieurs ou égaux à 5mm<sup>457</sup>. En 2010, une étude européenne multicentrique a conclu à une incidence en Allemagne de 53% pour les 35-44 ans et 89% pour les 65-74 ans et moins prononcée au Danemark (20% et 63,1%, respectivement)<sup>459</sup>.

L'une des enquêtes épidémiologiques les plus récentes repose sur les données 2009-2012 de la National Health and Nutrition Survey (NHANES) aux États-Unis, menée sur 3742 adultes de plus de 30 ans. Cette étude conclut à une incidence de 46% dans cet échantillon (soit théoriquement 64,7 millions d'américains) et que 64% des sujets de plus de 65 ans présentent une parodontite modérée à sévère<sup>460</sup>.

Il ressort de ces études que les maladies parodontales représentent un problème de santé publique avéré au niveau mondial puisque 40% des extractions dentaires sont la conséquence directe de l'évolution morbide des parodontites. Malgré cela, ces maladies sont encore mal connues, sous-diagnostiquées et le déchaussement dentaire est encore trop souvent considéré comme un signe de vieillissement, alors qu'il s'agit principalement de la conséquence évolutive de la maladie inflammatoire chronique certainement la plus fréquente chez l'homme.

### III. Éléments diagnostiques des maladies parodontales

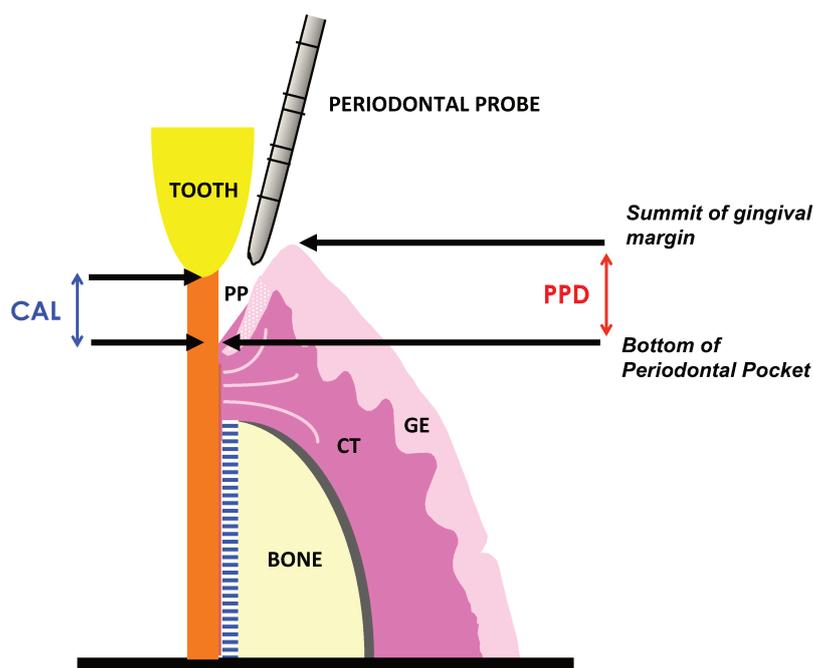
De nombreuses études basées sur l'auto-évaluation ont montré que bien souvent les patients étaient capables d'évaluer correctement mais grossièrement leur statut parodontal<sup>461</sup>.

Toutefois, l'évaluation de la sévérité de la parodontite nécessite un examen clinique réalisé par un chirurgien-dentiste au moins basé sur le sondage parodontal (*Figure 9*). La PPS et le saignement gingival au sondage sont considérés comme les marqueurs les plus fiables de l'activité de la maladie ou de l'inflammation. Le CAL et la perte d'os alvéolaire reflètent davantage l'histoire et la sévérité de la maladie parodontale.

La profondeur de la poche parodontale au sondage (PPS) : Cet examen est la mesure entre le rebord gingival et le fond de la poche parodontale. Le sondage est réalisé à l'aide d'une sonde millimétrée, introduite de façon indolore dans l'espace entre la dent et la gencive. Cet espace est appelé "sulcus gingival" en situation physiologique (sondage est inférieur à 3mm) ou "poche parodontale" en situation pathologique (sondage est supérieur à 3mm).

Cette mesure augmente en fonction de la sévérité de l'atteinte parodontale et permet de mettre en évidence le degré de sévérité de la maladie parodontale (*Figure 9*).

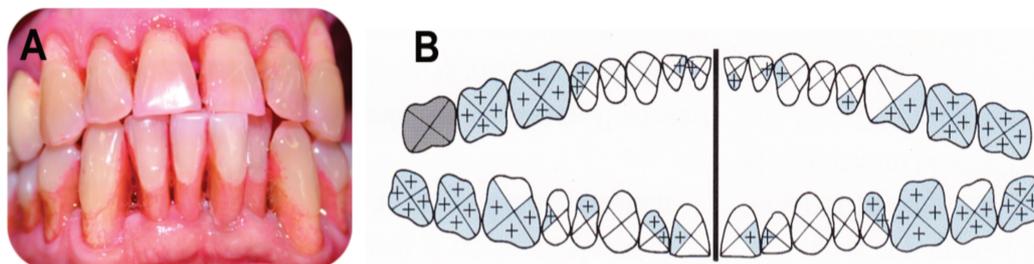
Le niveau d'attache clinique (CAL) : Cet examen correspond à la mesure entre la jonction amélo-cémentaire de la dent (un repère anatomique fixe) et le fond de la poche parodontale. Il met en évidence le degré de sévérité de la maladie parodontale. In fine, il correspond à la mesure de la PPS additionnée à la hauteur de la récession gingivale (*Figure 9*).



*Figure 9 : Schéma d'une dent, de son parodonte et des principaux indices cliniques.*

*PP (periodontal pocket ou poche parodontale), PPD (periodontal pocket depth ou profondeur de poche au sondage), CAL (clinical attachment level ou niveau d'attache clinique), CT (connective tissue ou tissu conjonctif), GE (gingival epithelium ou épithélium gingival), Bone (os), Peridontal Probe (sonde parodontale) et Tooth (dent).*

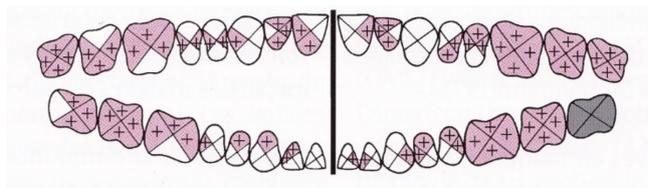
L'Indice de Plaque (Plaque Index, PI) : Il permet d'apprécier le degré d'hygiène bucco-dentaire et la qualité de l'élimination de la plaque bactérienne par le patient. On détermine la présence (+) ou l'absence ( ) de plaque supra-gingivale grâce à un révélateur coloré de la plaque sur les quatre faces de chaque dent (*Figure 10*)<sup>462</sup>.



*Figure 10 : Évaluation de l'indice de plaque.*

(A) Utilisation d'un révélateur de plaque coloré (B) Schéma de détermination de la présence ou de l'absence de plaque. L'index de plaque (PI en %) se calcule selon la formule : (nombre de sites avec plaque / nombre total de sites mesurés)\*100.

- Le Saignement Gingival au Sondage (Bleeding On Probing, BOP) : Il met en évidence l'état inflammatoire de la gencive. Il est déterminé pour les quatre faces de la dent si après sondage un saignement apparaît (+) ou pas ( ) sans graduation (*Figure 11*)<sup>462</sup>.



*Figure 11 : Évaluation du saignement gingival au sondage.*

Cet indicateur (BOP en %) se calcule selon la formule : (nombre de sites avec saignement / nombre total de sites mesurés)\*100.

#### **IV. Anatomopathologie des maladies parodontales**

Les maladies parodontales sont caractérisées par une inflammation du système d'attache épithélio-conjonctif. L'espace entre le tissu mou et la surface radiculaire devient une poche parodontale et constitue un réservoir de bactéries (*Figure 12*).

En 1976, R.C. Page et H.E. Schroeder ont décrit histologiquement la progression de l'inflammation dans le conjonctif gingival. Ils ont distingué cinq stades histopathologiques dans le développement des lésions parodontales (gencive saine, lésion initiale, lésion précoce, lésion établie, lésion avancée)<sup>463</sup>.

La gencive cliniquement saine est caractérisée par un aspect rose, ferme, ne saignant pas au sondage et devrait être, théoriquement, exempte de signes histologiques d'inflammation. Elle correspond à l'état inflammatoire basal obtenu par un nettoyage méticuleux quotidien (*Figure 12.A*). À ce stade, l'épithélium de jonction est intact et comporte quelques leucocytes, des monocytes proches de la membrane basale et des polynucléaires neutrophiles (PNN) proches de la dent.

Cet état de santé parodontale est maintenu grâce à un épithélium de jonction intact, une desquamation régulière des cellules de l'épithélium, un effet de chasse dans le sulcus exercé par le fluide gingival, la présence d'anticorps dans ce fluide gingival et le pouvoir de phagocytose des neutrophiles et des macrophages. Chez les sujets sains, cet état est stable (*Figure 12.A*)<sup>464</sup>.

La lésion initiale correspond à une gencive saine qui présente peu de plaque, un épithélium de jonction normal avec quelques PNN, un fluide sulculaire faible, un réseau de collagène dense et des fibroblastes intacts (*Figure 12.B*).

En général, après quatre jours sans contrôle de plaque (sans brossage des dents), la plaque sur la surface dentaire se développe légèrement et une inflammation a lieu. Il est possible d'observer une dilatation des vaisseaux sanguins entraînant une augmentation de la vascularisation. La pression hydrostatique dans la microcirculation augmente ce qui entraîne des lacunes entre les cellules endothéliales et ainsi des protéines plasmatiques peuvent exsuder dans les tissus. Le flux de fluide gingival augmente, les substances délétères du biofilm sont diluées dans le sulcus. Les bactéries sont évacuées de ce sulcus pour se mêler à la salive, c'est ce que l'on nomme l'effet de chasse.

Pendant cette première phase de réponse de l'hôte, les PNN sont attirés par des facteurs chimiotactiques d'origine bactérienne et issus des cellules de l'hôte. Leur migration et leur sortie des vaisseaux sanguins sont facilitées par des molécules dont ELAM-1 (Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1).

Les lymphocytes sont, au contraire, confinés dans les tissus gingivaux. Ces processus ne sont qu'une réaction physiologique face à une gingivite initiale qui n'est pas considérée comme un début de maladie (*Figure 12.B*)<sup>464</sup>.

La lésion précoce se développe après quatre à sept jours d'accumulation de plaque (présence de bactéries Gram+) et la réponse cellulaire est bien établie (*Figure 12.C*). Les vaisseaux demeurent dilatés et leur nombre augmente. Cette néo-vascularisation se traduit cliniquement par un liséré gingival rouge. La gencive marginale change de couleur et devient érythémateuse, ce qui est un signe clinique caractéristique de la gingivite.

À ce stade, l'infiltrat cellulaire inflammatoire occupe environ 15% du volume du conjonctif au niveau sub-épithélial. Les PNN et les lymphocytes sont les cellules prédominantes qui continuent à migrer et il y a peu de PC supplémentaires.

Il est possible d'observer une dégénérescence des fibroblastes ainsi qu'une dégradation des fibres de collagène favorisant l'infiltration des leucocytes. Les cellules de l'épithélium de jonction et de l'épithélium sulculaire prolifèrent, ce qui permet de renforcer cette zone de jonction et d'éviter la prolifération bactérienne en direction apicale.

Malgré cette prolifération, les premiers signes d'une destruction tissulaire apparaissent avec la perte de la partie coronaire de l'épithélium de jonction. Un espace se forme entre cet épithélium et la dent, le biofilm sous-gingival apparaît (*Figure 12.C*)<sup>464</sup>.

L'intervalle de temps pour passer d'une lésion précoce à une lésion établie dépend de la susceptibilité du sujet atteint et cette période peut être longue.

Si l'exposition des tissus aux bactéries et produits bactériens de la plaque sous-gingivale se poursuit, la réponse inflammatoire des tissus gingivaux croît et l'inflammation gagne en sévérité et en profondeur (*Figure 12.D*). Le flux gingival (ou exsudat fluïdique) augmente, de ce fait l'augmentation de volume des tissus devient cliniquement visible (œdème) de même que les autres signes cliniques de l'inflammation. L'œdème gingival entraîne la formation d'une fausse poche. La lésion établie correspond cliniquement à la gingivite.

De nombreux PNN migrent à travers l'épithélium de jonction conjointement à la perte de collagène et à la détérioration des fibroblastes dans les tissus et dans le sulcus. La lésion établie est dominée par les PC au niveau de la gencive marginale. Des immunoglobulines sont retrouvées dans le tissu conjonctif, l'épithélium de jonction et le sillon.

Il faut certainement plusieurs semaines ou même plusieurs mois chez certains patients pour atteindre ce stade de lésion établie. La destruction du collagène se poursuit et s'étend en profondeur tandis que les digitations de l'épithélium gingival continuent à proliférer, deviennent de plus en plus profonde et se substituent à l'épithélium de jonction pour former l'épithélium de poche qui lui n'est pas attaché à la surface de la dent. Cet épithélium, plus perméable, possède de nombreux leucocytes polymorphonucléaires (PMN) et peut présenter des ulcérations à certains endroits. Cette lésion établie peut rester stable durant des mois ou des années, ou peut aussi bien évoluer vers la lésion avancée relativement rapidement, sans que le mécanisme de cette évolution ou de cette stabilité soit bien éclairci actuellement (*Figure 12.D*)<sup>464</sup>.

Si la lésion établie continue d'évoluer, la poche s'approfondit, la plaque progresse en direction apicale et dans cette niche anaérobie, les bactéries parodontopathogènes trouvent un environnement favorable à leur développement (*Figure 12.E*). À ce stade, l'infiltration de lymphocytes, de PC et de PNN est massive avec une réaction inflammatoire pathologique.

L'alvéolyse, c'est à dire la résorption de l'os alvéolaire, avec atteinte du parodonte profond caractérise le passage à la lésion avancée. Parallèlement à la migration apicale de l'épithélium de jonction, une vraie poche parodontale se développe. En raison de la destruction du collagène, le tissu gingival offre une faible résistance au sondage parodontal (sondage dans le tissu conjonctif). Du point de vue anatomo-pathologique, la lésion établie (gingivite) et la lésion avancée (parodontite) présentent les mêmes caractéristiques, à cette dernière s'ajoute une destruction des tissus de soutien de la dent et de l'os alvéolaire (*Figure 12.E*)<sup>464</sup>.

Ainsi, les maladies parodontales ne sont pas des maladies osseuses mais des maladies de l'ensemble du système d'attache de la dent. Elles impliquent des phénomènes généraux de l'inflammation avec des phénomènes vasculaires et cellulaires (mobilisation des PNN et recrutement des cellules immunocompétentes dont les PC).

L'épithélium de jonction est le lieu d'équilibre ou de conflits entre les mécanismes de résistance immunologique du tissu et les agressions de la plaque bactérienne. Cet épithélium constitue une des clés de l'initiation de la lésion parodontale.

Il est à noter que la poche parodontale est définie par plusieurs critères dont :

- une perte d'attache,
- une prolifération en direction apicale,
- une transformation de l'épithélium de jonction en épithélium de poche.

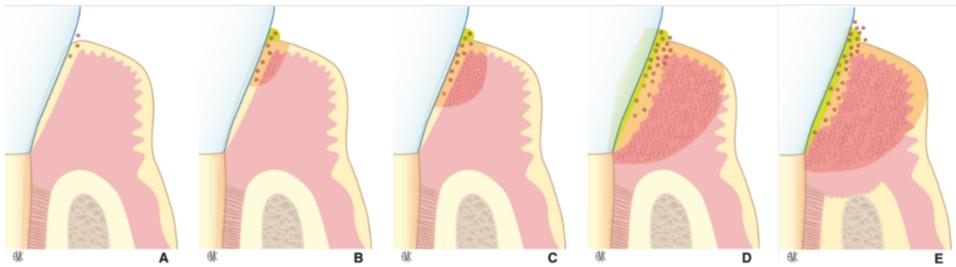


Figure 12 : Développement histopathologiques des lésions parodontales<sup>463,464</sup>.

Les cinq stades sont la gencive saine (A), la lésion initiale (B), la lésion précoce (C), la lésion établie (D) et la lésion avancée (E).

## V. Maladies parodontales et santé

La parodontite a des conséquences majeures sur la santé du patient tant au niveau oral que systémique.

### 1. Conséquences du déchaussement dentaire

La conséquence majeure au niveau oral concerne le déchaussement dentaire. Le caractère inflammatoire de la parodontite provoque la destruction progressive de l'assise parodontale, notamment de l'os alvéolaire, provoquant ainsi la mobilité puis le déchaussement dentaire.

L'édentation affecte directement la capacité du patient à s'alimenter correctement. Si les conséquences d'un déséquilibre nutritionnel peuvent être compensées et prévenues dans les sociétés riches, la difficulté à mâcher correctement une nourriture solide constitue un handicap majeur pour les populations âgées qui sont les plus démunies économiquement. Il va sans dire que les conséquences sont majeures dans les pays en voie de développement.

Les conséquences psycho-sociales sont moins visibles mais également très invalidantes. Le patient parodontalement atteint verra son rapport à l'autre largement détérioré en particulier compliqué par une mauvaise odeur émanant de la cavité buccale ou halitose.

Il a été mis en évidence que les personnes atteintes de parodontite présentaient un risque d'halitose 3,16 fois plus élevé<sup>465</sup>.

De plus, des études mettent en évidence une association entre parodontites chroniques et un faible degré du score de qualité de vie (Oral Health-Related Quality of Life, OHRQoL) ainsi qu'une corrélation significative avec la sévérité de la pathologie chez les patients adultes.

Ainsi, les parodontites sont directement associées à l'OHRQoL et le traitement de la maladie peut améliorer la qualité de vie du point de vue du patient<sup>466-468</sup>. Au niveau psychologique, il a été remarqué que les patients avec une parodontite chronique (CP) présentaient un pourcentage significativement plus élevé d'anxiété et de phobies<sup>469</sup>.

## 2. Conséquences des parodontites sur la santé générale

La permanence d'un foyer infectieux et inflammatoire oral est à l'origine de la diffusion systémique d'agents infectieux et de facteurs inflammatoires, susceptibles d'entraîner des manifestations pathologiques à distance du foyer d'origine<sup>1,4</sup>.

Au cours des deux dernières décennies, un nombre croissant de publications met en évidence des corrélations très significatives entre parodontites et diverses maladies systémiques.

Parodontites et maladies cardiovasculaires : Les patients atteints de parodontites sévères présentent un risque accru de développer une maladie coronarienne<sup>470</sup>, une hypertension artérielle<sup>471</sup> et d'athérosclérose (facteur de risque de 1,5) corrélée à une élévation des marqueurs inflammatoires dont l'IL-6<sup>472</sup>.

Parodontites et maladies pulmonaires : De nombreuses données épidémiologiques montrent une augmentation du risque de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) chez les patients atteints de parodontites avec des facteurs de risque de 1,8 à 4,5<sup>473,474</sup>.

Les bactéries orales pourraient participer à l'infection respiratoire de la région oro-pharyngée par :

- une réaction directe des pathogènes oraux présents dans la plaque dentaire par inhalation. En effet, la plaque dentaire est une source locale de *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) qui peuvent se détacher des sécrétions orales et contaminer l'arbre respiratoire,
- une réaction des enzymes associée aux parodontites présentes dans la salive qui peuvent modifier les surfaces muqueuses pour favoriser l'adhésion et la colonisation des pathogènes respiratoires. Ces enzymes peuvent altérer les mucines et réduire leur capacité à éliminer les pathogènes respiratoires,
- une réaction immunitaire au travers des cytokines synthétisées et libérées à cause des bactéries parodontopathogènes qui peuvent altérer l'épithélium respiratoire, recruter des neutrophiles sur les sites pulmonaires et promouvoir l'infection par des pathogènes respiratoires<sup>475</sup>.

Parodontites et diabète : L'association bilatérale avec le diabète est supportée par plusieurs études. La composition du microbiote parodontal chez un patient diabétique par rapport à un patient sain semble différente avec une détection majorée de *Pg*, *Prevotella intermedia* (*Pi*) et *Campylobacter rectus* (*Cr*). Il est possible qu'il y ait une certaine influence du diabète sur le microbiote parodontal<sup>476,477</sup>.

Dans le diabète, il y a une accumulation des produits glyqués du glucose (advanced glycation end products, AGE) qui ont un pouvoir chimiotactique sur les monocytes et les macrophages.

Cela va entraîner une sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) par ces cellules<sup>478</sup>. Ces produits sont également capables d'augmenter la voie RANKL/OPG dans les macrophages ce qui va conduire à la résorption osseuse<sup>479</sup>.

Enfin, une récente étude a mis en évidence que le traitement parodontal est associé à une réduction du niveau d'hémoglobine glyquée (HbA1c). Le dépistage précoce et à la prévention de ces deux pathologies qui interagissent entre elles sont fortement encouragés<sup>480</sup>.

Parodontites et maladies neurologiques : Au niveau neurologique, les recherches se sont concentrées sur un lien potentiel entre les maladies parodontales et la maladie d'Alzheimer. La dégradation de la santé buccale en raison de leur déficience cognitive progressive qui affecte leurs habitudes d'hygiène orale est le premier niveau de preuve d'une association entre la maladie d'Alzheimer et les parodontites<sup>481</sup>.

Il est proposé que la parodontite pourrait accélérer la maladie d'Alzheimer au travers de la diffusion via la barrière hémato-encéphalique de cytokines pro-inflammatoires susceptibles d'entraîner l'activation des cellules de la microglie et les lésions neuronales associées à la pathologie. Des niveaux accrus de précurseur du peptide Aβ (APP) ont été révélés chez les patients atteints de CP. Il est également possible que les bactéries résidentes du biofilm de la plaque dentaire puissent envahir le cerveau et contribuer localement à l'inflammation<sup>482</sup>.

Parodontites et grossesse : Il existe une association positive et indépendante entre la parodontite et les pathologies de la femme enceinte avec un risque accru de naissance prématurée<sup>483</sup> et de pré-éclampsie, pathologie inflammatoire multifactorielle, cause majeure de mortalité périnatale<sup>484</sup>.

Parodontites et cancers : La relation entre les parodontites et les cancers est étudiée depuis plusieurs décennies, mais le lien entre la maladie parodontale et le risque global de cancer suscite un intérêt croissant, l'inflammation systémique étant au centre de la plausibilité biologique. De nombreuses études cas-témoins ont porté sur le rôle de la santé bucco-dentaire dans les cancers de la tête et du cou et plusieurs études de cohortes ont examiné les associations avec d'autres types de cancers.

Une récente méta-analyse de la littérature sur ce sujet confirme une association positive entre les parodontites et le risque de cancers de la bouche, du poumon et du pancréas<sup>485</sup>.

De plus, une récente étude américaine incluant 7466 patients suivis de manière prospective sur plusieurs années met en évidence que les patients atteints de parodontite présentent un risque plus élevé de développer des cancers du poumon et des cancers colorectaux<sup>486</sup>.

Concernant les cancers colorectaux, il a été récemment mis en évidence qu'ils sont associés à la présence de bactéries parodontopathogènes dont *Fusobacterium nucleatum* et *Prevotella sp.*<sup>487</sup>.

Parodontites et maladies auto-immunes : Des liens bidirectionnels sont décrits entre PR et la CP<sup>488</sup>. Comme précédemment décrit (cf. Introduction, Partie 1, VIII.4.c.), la PR est une pathologie auto-immune chronique, dégénérative, caractérisée par la présence d'auto-anticorps circulant (le facteur rhumatoïde (FR) et les anticorps anti-protéines/peptides citrullinés (ACPA)) et à étiologie multifactorielle comme les maladies parodontales.

Un premier indice liant ces deux pathologies est le partage d'un même facteur de risque génétique. En effet, l'épitope partagé HLA-DRBA a été identifié comme une prédisposition génétique à ces deux maladies<sup>489</sup>.

De plus, il a été mis en évidence que les bactéries pathogènes de la parodontite pouvaient contribuer aux maladies auto-immunes au travers de l'induction de la production de cytokines inflammatoires de la réponse T régulatrice Th1<sup>7490</sup>.

Par ailleurs, la maladie parodontale favorise l'inflammation par le passage de bactéries et de cytokines pro-inflammatoire dans le sang. Dans la pathogénèse de la PR, *Pg* joue un rôle spécial.

En effet, il a été mis en évidence que *Pg* exprimait la peptidyl-arginine-désiminase (PAD) qui catalyse la citrullination de l'arginine. Or l'auto-immunité de la PR est caractérisée par la présence d'auto-anticorps dirigés contre les protéines humaines citrullinées dont l' $\alpha$ -énolase et il existe une similitude de séquence entre l' $\alpha$ -énolase de *Pg* et de l'homme <sup>491</sup>. Ainsi, *Pg* pourrait donc être impliquée dans le déclenchement de la réponse auto-immune en augmentant le taux de protéines citrullinées, favoriser la production d'ACPA et initier la PR<sup>492,493</sup>.

De plus, il a été récemment mis en évidence que la thérapeutique parodontale initiale entraînait une diminution de la protéine C-réactive qui est également un marqueur de la PR<sup>494</sup>.

## **VI. Traitement actuel des parodontites**

Le traitement conventionnel des parodontites repose essentiellement sur la diminution de la charge globale des microorganismes parodontaux grâce à l'élimination mécanique de la plaque dentaire par un professionnel. Cet assainissement, mis en place lors d'une thérapeutique initiale non chirurgicale, comprend le détartrage supra-gingival et surfaçage radiculaire sous-gingival dans le but d'éliminer le tartre et le biofilm. Une adjonction d'antibiotiques est préconisée dans le cas des parodontites agressives.

Ce traitement initial est systématiquement associé à un entretien mécanique et chimique à long terme, par brossage associé aux dentifrices et bains de bouche, réalisé par le patient sensibilisé à l'hygiène orale<sup>495</sup>.

Après réévaluation à 8 semaines<sup>496</sup>, si le contrôle de plaque est optimal et que les signes cliniques ont disparu, le patient passera en phase de maintenance.

Cependant, si le contrôle de plaque est correctement assuré par le patient, mais que les signes cliniques de la maladie persistent, un traitement chirurgical par lambeau d'assainissement peut être envisagé. Chez un patient qui présente des lésions osseuses sévères associées à des poches parodontales profondes, le traitement chirurgical va permettre l'accès direct et visuel aux lésions, la réduction des poches et dans certains cas le remodelage ou le comblement osseux.

Un suivi d'au moins 4 à 6 mois est conseillé. Puis, le patient entre en « maintenance parodontale » ou suivi parodontal, dont la fréquence (bi-annuelle à annuelle) sera édictée par la pathologie initiale, son degré de sévérité et son éventuelle association à des cofacteurs de risques.

Parallèlement, les facteurs environnementaux, tels que le tabagisme, le stress ou la recherche d'un diabète non traité, sont au premier plan dans la lutte contre les parodontopathies.

Cependant, des cas de récurrence et de parodontites réfractaires sont fréquemment observées et l'hypothèse bactérienne ne semble pas suffisante à elle seule pour expliquer le développement et la persistance de la maladie parodontale.

## VII. Étiopathogénie des parodontites

### 1. Dysbiose bactérienne et parodontite

Les maladies parodontales sont principalement envisagées aujourd'hui comme étant le résultat de la colonisation des surfaces et des espaces parodontaux par des microorganismes ayant la capacité d'entraîner une réaction inappropriée de l'hôte marquée cliniquement par plusieurs modifications du système d'attache parodontale. Dans ce contexte, le rôle de la flore bactérienne ou biofilm bactérien mérite d'être individualisé.

La cavité orale définit un espace non-stérile unique positionné à l'entrée des voies digestives et respiratoires et exposé de façon permanente aux microorganismes. Elle constitue un site primaire de fixation microbienne dont on sait qu'il oriente de nombreuses colonisations secondaires et qu'il façonne l'immunité. Son rôle dans la défense de l'organisme contre les infections est essentiel et il existe un lien fort entre écologie microbienne orale et santé générale.

Le terme d'écologie microbienne orale est souvent avancé pour signifier l'existence d'une flore microbienne orale complexe – comprenant au sens large virus, bactéries et champignons, archeobactéries, parasites – qui fonctionne en équilibre symbiotique avec son environnement. Les progrès en matière d'analyse génomique (séquençage à haut débit, notamment) ont permis d'approfondir les connaissances concernant l'analyse du microbiote humain. Ces études mettent en évidence la spécificité du microbiome de chaque organe (intestin, cavité orale, peau ...) mais aussi la variabilité entre individus<sup>497</sup>.

La cavité orale définit une niche écologique dont le microbiome commence à être bien caractérisé (Human Oral Microbiome Database (HOMD) : <http://www.homd.org/>).

Le microbiome oral est composé de plusieurs dizaines de milliers d'espèces différentes de microorganismes existant en majorité sous des formes adhérentes (« biofilms organisés ») et en minorité sous formes libres (« planctoniques »)<sup>5,498</sup>.

Cette flore infectieuse complexe est souvent assimilée à un biofilm intégral symbiotique qui fonctionne en équilibre au contact des muqueuses et autres supports de la bouche (dents, tartre, biomatériaux, prothèses).

La bonne santé orale repose sur une symbiose impliquant la colonisation des tissus oraux par une flore microbienne diversifiée et le contrôle de ces infections par la réponse de l'hôte.

Les causes du basculement d'une situation saine à une situation pathologique sont multiples et restent la plupart du temps difficiles à établir. Cependant, la situation pathologique met souvent en évidence une pullulation microbienne, une évolution de la composition de la flore microbienne caractérisée par l'émergence d'espèces pathogènes et une exacerbation des réactions inflammatoires<sup>4,499</sup>.

Lorsque le nombre et la distribution des micro-organismes changent, cet équilibre est rompu.

On parle alors de « dérive anaérobie » et on observe une dysbiose<sup>500</sup>. Dans ce déséquilibre, la réponse inflammatoire s'intensifie et les interactions biochimiques et cellulaires signent le début de la maladie qui se poursuit par une série de perturbations dans le métabolisme du tissu conjonctif et osseux pour aboutir à la destruction des tissus parodontaux<sup>463</sup>.

La sévérité et la rapidité de la progression de la pathologie parodontale s'expliqueraient par la fréquence et l'intensité avec lesquelles quatre conditions sont réunies :

- 1) la présence de bactéries pathogènes (bactéries anaérobies à gram négatif),
- 2) l'absence de bactéries protectrices (bactéries aérobies à gram positif),
- 3) un environnement dento-gingival défavorable,
- 4) une défaillance du système immunitaire de l'hôte<sup>501</sup>.

Traditionnellement, les bactéries sont considérées comme parodontopathogènes selon les critères édictés par Socransky et al., en 1979 :

- 1) les bactéries sont présentes en forte proportion dans les sites lésionnels,
- 2) elles sont capables de stimuler une réponse immunitaire de l'hôte,
- 3) elles sont capables de produire des facteurs de virulence,
- 4) elles sont capables d'induire des lésions dans un modèle animal,
- 5) il est possible de constater une amélioration clinique suite à un traitement visant à l'élimination de ces bactéries<sup>464</sup>.

Le développement de la microbiologie parodontale a abouti à l'identification de plus de 1200 espèces bactériennes<sup>502</sup> et 19000 phénotypes<sup>503</sup> dans la cavité buccale.

Cependant, un peu moins de 20 d'entre elles sont considérées comme des parodontopathogènes majeures<sup>504,505</sup>. Socransky et al., ont prélevé 13261 échantillons de plaque sur 185 sujets et ont mis en évidence une association d'espèces bactériennes dans le biofilm sous-gingival. Ces espèces ont été classées complexes bactériens auxquels une couleur a été donnée en fonction de leur sévérité de leur pathogénicité<sup>506</sup> (*Figure 13*).

Dans ces complexes bactériens, il est distingué :

- 1) le complexe rouge constitué des espèces *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Tannerella forsythia* (Tf) et *Treponema denticola* (Td). Ce complexe est en lien avec la profondeur de poche et la présence de saignement au sondage signant l'activité de lésions parodontales,
- 2) le complexe orange composé des espèces *Prevotella (intermedia et nigrescens)*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum (Vincentii, Nucleatum, Polymorphum)*, *Fusobacterium peridotonicum*, *Campylobacter (gracilis, rectus et showae)*, *Eubacterium nodatum*, *Streptococcus constellatus*,
- 3) le complexe vert contenant les espèces *Capnocytophaga (gingivalis, sputigena et ochracea)*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sérotype a,
- 4) le complexe jaune formé des *Streptococcus (dont sanguis, mitis et oralis)*,
- 5) le complexe violet représenté par les espèces *Actinomyces odontolyticus* et *Veillonella parvula*,
- 6) le groupe des espèces d'*Actinomyces*,
- 7) *Selenomonas noxia* et *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* sérotype b qui ne rentrent dans aucun complexe.

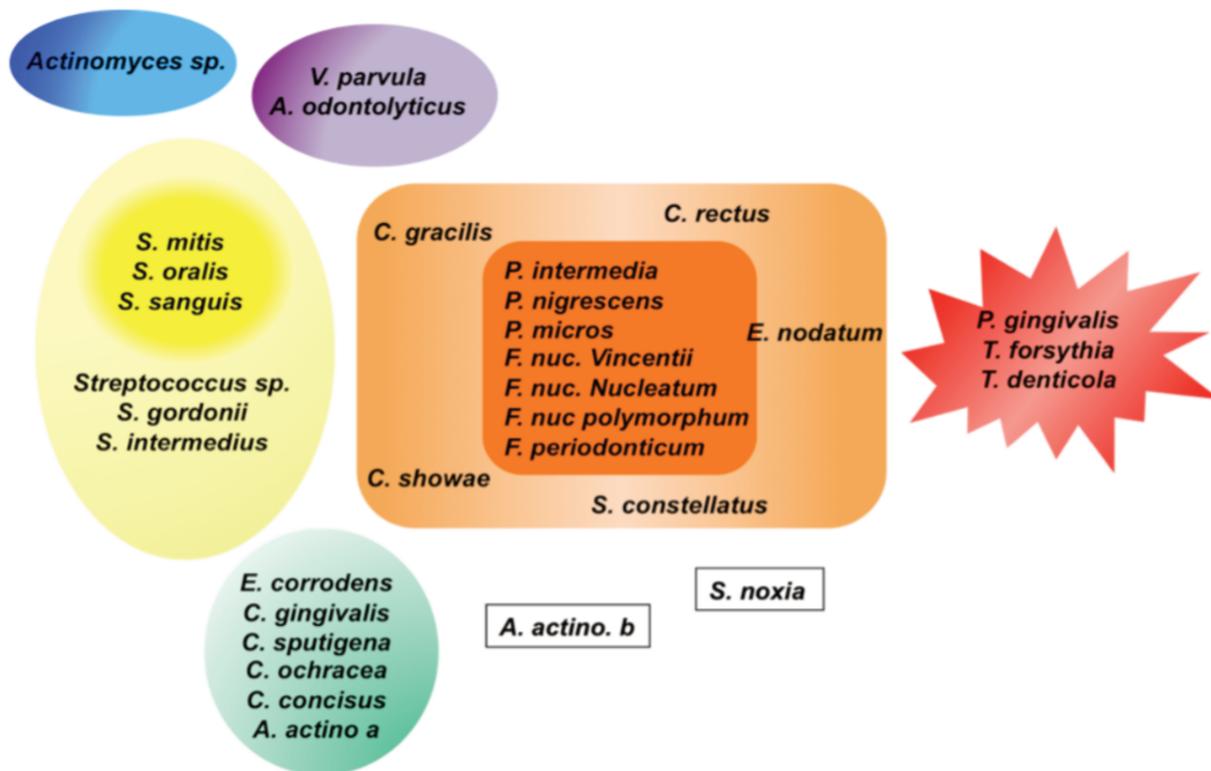


Figure 13 : Les complexes microbiens<sup>505</sup>.

Les bactéries des complexes « vert », « jaune » et du groupe des espèces d'Actinomyces (représentées en bleu) sont les colonisateurs primaires de la surface de la dent. Les bactéries des complexes « orange » et « violet » s'attachent à ces colonisateurs précoces. Les bactéries du complexe « rouge » s'attachent aux bactéries du complexe « orange ».

Il est à noter qu'il existe une association d'espèces à l'intérieur des complexes. Les résultats montrent que dans les plaques prélevées, le plus souvent soit aucune des bactéries du complexe n'est présente soit toutes y sont présentes. Il est donc probable que lorsqu'une espèce d'un complexe est présente dans une poche parodontale, les autres espèces du même complexe le sont probablement aussi.

De plus, il existe une relation entre les complexes. Par exemple, les membres du complexe rouge sont rarement retrouvés en l'absence des membres du complexe orange.

La connaissance des associations entre les espèces sous-gingivales peut être utilisée comme un guide de la thérapie parodontale. On peut émettre l'hypothèse qu'une altération thérapeutique du complexe orange pourrait prévenir la colonisation par le complexe rouge.

Enfin, il existe une relation entre certaines espèces bactériennes et le degré d'atteinte de la maladie parodontale. En effet, les espèces des complexes rouge et orange ont une très forte influence sur la profondeur de poche. Les sites n'ayant aucune des espèces du complexe rouge ont les profondeurs de poches les plus faibles. Le complexe rouge et les espèces seules de ce groupe sont aussi associés au saignement au sondage. Ce complexe rouge est considéré comme le plus significatif dans le diagnostic parodontal étant donné sa forte corrélation avec les paramètres cliniques<sup>505</sup>.

## 2. Virulence bactérienne et inflammation

Les bactéries pathogènes les plus étudiées sont *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*), *Tannerella forsythensis* (*Tf*), *Campylobacter rectus* (*Cr*), *Eikenella corrodens* (*Ec*) et ce sont celles qui produisent le plus de facteurs de virulence parmi les bactéries retrouvées dans la cavité orale<sup>507</sup>. Les bactéries contribuent à la destruction tissulaire de façon directe par la libération d'enzymes et de substances cytotoxiques qui vont avoir une action protéolytique bactérienne.

Les bactéries peuvent libérer des enzymes telles que les protéases les collagénases, les hyaluronidases. Par exemple, l'interaction entre *Pg* et les cellules épithéliales provoque la libération de protéases extracellulaires qui peuvent lyser les cellules épithéliales et la matrice extracellulaire<sup>508</sup>. De même, la production de toxines dont la plus connue est la leucotoxine, est fréquente. La leucotoxine sécrétée par *Aa* détruit les PMN, les monocytes et certaines sous populations de lymphocytes en créant des pores dans leur membrane.

Les autres toxines fréquemment impliquées sont le LPS (lipopolysaccharide, endotoxine des bactéries à Gram négatif), les hémolysines, les formylméthionylpeptides et l'acide lipoteichoïque<sup>508</sup>.

Le LPS bactérien a la capacité d'induire chez les macrophages, les fibroblastes ou les kératinocytes de l'hôte, la production d'enzymes lytiques appartenant à la famille des métalloprotéinases matricielle (MMP) et des endopeptidases. Les MMP sont les protéases les plus impliquées dans la destruction parodontale<sup>509</sup>. Elles dégradent les molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène, l'élastine ou les glycosaminoglycanes.

Il a été mis en évidence que les niveaux d'expression de MMP-1 et MMP-8 étaient plus importants chez les patients atteints de parodontite par rapport aux patients atteints d'une gingivite et aux individus sains<sup>510,511</sup>. MMP-1 est exprimée par les cellules résidentes telles que les fibroblastes, les monocytes/macrophages et les cellules épithéliales alors que MMP-8 est synthétisée par des neutrophiles infiltrés. Ces MMP sont sécrétées sous formes inactives (pro-enzymes) et leur activité enzymatique est régulée par un clivage protéolytique. Il a été démontré que ce clivage et donc cette activation pouvait être réalisée par des enzymes bactériens comme la chémotrypsine-like<sup>512</sup> ou par des enzymes de l'hôte dont la cathepsine G produite par les neutrophiles.

Enfin, certaines bactéries (dont *Pg* et *Aa*) ont la capacité de pénétrer dans les tissus gingivaux de l'hôte, notamment grâce à des phosphatases<sup>513</sup>. On retrouvera ces bactéries dans les espaces intercellulaires, mais également dans les cellules épithéliales ou conjonctives<sup>514</sup>.

A un niveau plus indirect, la réponse immunitaire déclenchée par les bactéries aboutit à la libération de cytokines pro-inflammatoires entraînant indirectement la dégradation tissulaire.

Au moins deux cytokines pro-inflammatoires, IL-1 et TNF- $\alpha$ , semblent avoir un rôle central dans la destruction parodontale<sup>515,516</sup>.

In vivo, l'IL-1 et le TNF- $\alpha$  ont été décrites comme des molécules clés dans la pathogénèse parodontale et retrouvées en concentration importante dans le fluide gingival des sites atteints de parodontite. De plus, il est rapporté qu'une réduction de cette concentration est associée à une thérapie réussie. L'IL-1 est retrouvée sous deux formes actives, IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$ , codées par deux gènes séparés. Ces deux molécules sont fortement pro-inflammatoires et sont des facteurs d'activation des ostéoclastes. Le TNF- $\alpha$  possède de nombreuses activités biologiques communes avec IL-1 dont la stimulation de la résorption osseuse. L'IL-1 est produite principalement par activation des macrophages (par le LPS bactérien) ou des lymphocytes mais aussi par d'autres cellules dont les monocytes, les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules endothéliales. Par ailleurs, dans ces cellules, le TNF- $\alpha$  peut activer la production d'IL-1, elle-même est capable d'activer sa propre production. Le TNF- $\alpha$  est aussi produit par activation des macrophages et particulièrement en réponse au LPS bactérien.

Parmi les cytokines majoritairement impliquées dans la destruction parodontale, on peut aussi citer RANKL qui joue un rôle important dans la régulation du métabolisme osseux et dans l'activation de l'ostéoclasie. Cette cytokine est produite par les ostéoblastes, les fibroblastes, les LT et les LB<sup>517</sup>.

Enfin, dans la liste des principaux médiateurs qui semblent impliqués dans le développement de la maladie parodontale, les prostaglandines qui sont des métabolites de l'acide arachidonique générées par les cyclooxygénases (dont COX-2 régulée par l'IL-1 $\beta$ ) jouent un rôle clé. La principale prostaglandine associée à l'inflammation est la prostaglandine E2 (PGE2) qui est produite principalement après activation des macrophages par le LPS bactérien mais aussi par les PMN et les fibroblastes. PGE2 provoque la vasodilatation, le recrutement des cellules inflammatoires, la production de collagène et l'activation des ostéoclastes. La présence de PGE2 dans un site parodontique est signe d'inflammation et de perte d'attache<sup>515</sup>. La perte osseuse associée à une maladie parodontale sévère est inhibée en partie par des inhibiteurs de la synthèse des prostaglandines. De même, l'utilisation d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (inhibant la synthèse des prostaglandines) chez des sujets atteints de parodontite avancée s'accompagne d'une perte osseuse diminuée par rapport à l'utilisation d'un placebo. Une réponse exagérée des monocytes au LPS bactérien par hypersécrétion de PGE2 peut être considérée comme un facteur de risque de parodontite<sup>518</sup>.

## VIII. La réponse inflammatoire

### 1. Aspects généraux

Comme nous l'avons vu précédemment, les bactéries possèdent une capacité de destruction tissulaire principalement induite par la réponse immunitaire qu'elles déclenchent et il est actuellement bien établi que la destruction du tissu conjonctif et de l'os alvéolaire est majoritairement imputable à un excès de réponse immuno-inflammatoire de l'hôte.

Dans le modèle proposé, les bactéries pathogènes initient l'inflammation parodontale et la réponse inflammatoire antibactérienne de l'hôte participe et accélère la dégradation du tissu conjonctif ainsi que la perte osseuse (*Figures 14 & 15*).

Les études comparant le statut immunitaire des tissus parodontaux de sujets sains et de sujets atteints mettent en évidence que les tissus parodontaux cliniquement sains, au contact de la microflore orale symbiote, maintiennent un léger état inflammatoire parfaitement contrôlé<sup>519</sup> avec par exemple l'établissement d'un gradient correct d'IL-8<sup>520</sup> qui guide constamment les PMN en direction de l'épithélium de jonction.

En revanche, dans les tissus avec parodontite, une augmentation des molécules inflammatoires (dont les Toll-Like Receptor TLR-2 et -4) normalement présentes en petites quantités est observée<sup>521</sup>.

L'inflammation légère et parfaitement contrôlée, retrouvée à l'état physiologique, laisse ainsi place à une inflammation sévère et désordonnée lors de la pathologie<sup>519</sup>. In fine, cette réaction inflammatoire de l'hôte aboutit à la destruction tissulaire et à la perte alvéolaire, c'est-à-dire au déclenchement de la parodontite.

Il existe deux grandes lignes de défense de l'hôte contre l'agression bactérienne : l'immunité innée et l'immunité acquise.

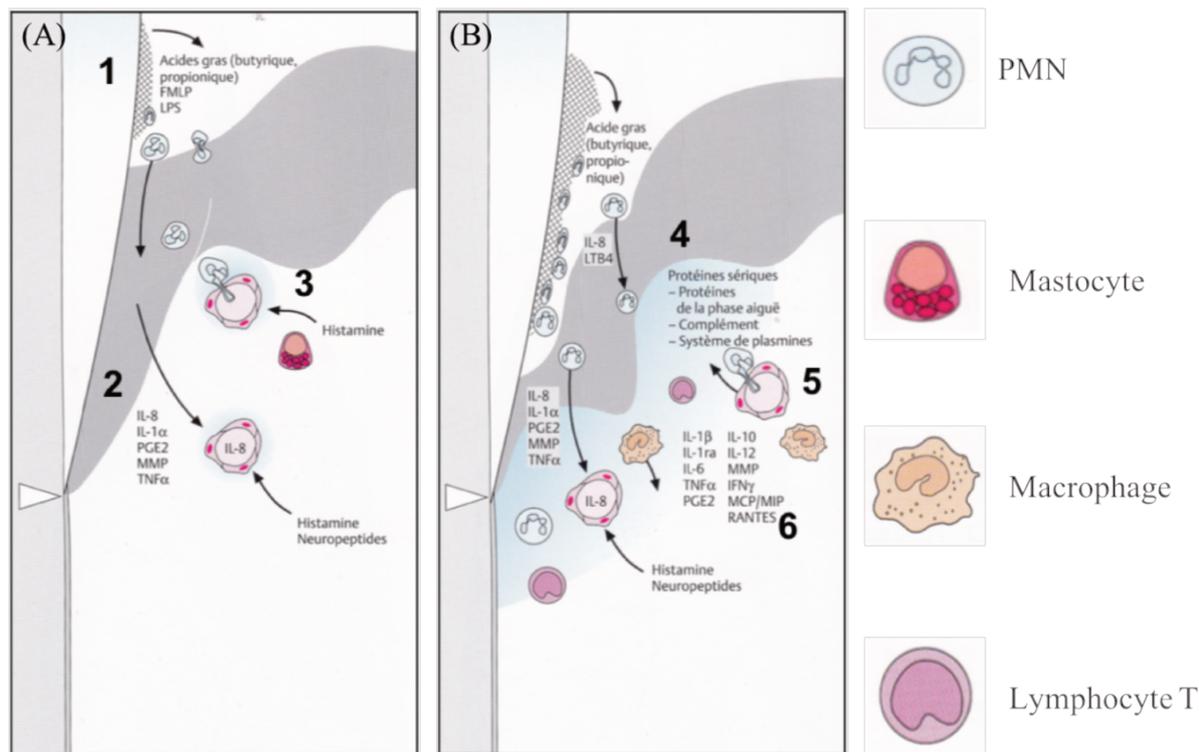
La réponse innée implique essentiellement des mécanismes de phagocytose et d'inflammation aiguë caractérisés par la production de médiateurs inflammatoires. L'agression du parodonte par les bactéries de la plaque se réalise par leur production de métabolites dont le LPS qui incitent les PMN de l'épithélium de jonction à sécréter des molécules inflammatoires dont l'IL-1, l'IL-8, le TNF- $\alpha$ , la PGE2 et les MMP et activent le Complément.

L'activation du Complément en réponse à l'infection bactérienne va générer des dérivés du Complément, les anaphylatoxines dont C3a et C5a. Ces dérivés vont indirectement stimuler les échanges vasculaires en causant la dégranulation et l'activation des mastocytes résidents à l'intérieur des tissus de soutien de la gencive.

Les mastocytes libèrent de l'IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$  et surtout l'histamine qui incite l'endothélium à déverser de l'IL-8 dans les vaisseaux sanguins. L'épithélium de jonction sécrète de l'IL-8 et des molécules d'adhésion intercellulaires dont ICAM-1. Ainsi, un gradient se crée entre ICAM-1 à la surface de l'épithélium et l'IL-8 soluble pour permettre la migration trans-épithéliale des PMN dans le sulcus (*Figure 14.A*).

Ensuite, les veinules post-capillaires s'élargissent en réaction aux substances signaux (histamine, prostacyclines), le flux se ralentit. Cette réaction vasculaire provoque le passage des protéines sériques (par exemple du Complément) dans le tissu conjonctif et active la réaction inflammatoire locale. Les cellules endothéliales et les PMN expriment les adhésines qui permettent l'adhérence des PMN à la paroi des vaisseaux et leur diapédèse dans le tissu irrité. Les PMN sont les premiers leucocytes à arriver au niveau du site inflammatoire et sont toujours dominants à l'intérieur de l'épithélium de jonction et du sulcus gingival. Les monocytes sont ensuite recrutés et les macrophages activés produisent des médiateurs de l'inflammation dont des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ), la PGE2, les MMP et des chimiokines (MCP, MIP, RANTES). Une fois la cellule bactérienne liée aux neutrophiles, elle est phagocytée à l'intérieur d'une structure membranaire (phagosome) où elle est tuée selon un mécanisme oxydatif ou non oxydatif.

La poche parodontale est caractérisée par une hypoxie ainsi qu'un potentiel d'oxydo-réduction réduit par rapport au sulcus normal. Le mécanisme de mort oxydative des neutrophiles est généralement intact chez le sujet sain mais peut être détérioré dans la poche parodontale. L'absence de mécanismes de mort oxydative est certainement un facteur important de progression de la maladie parodontale (*Figure 14.B*).



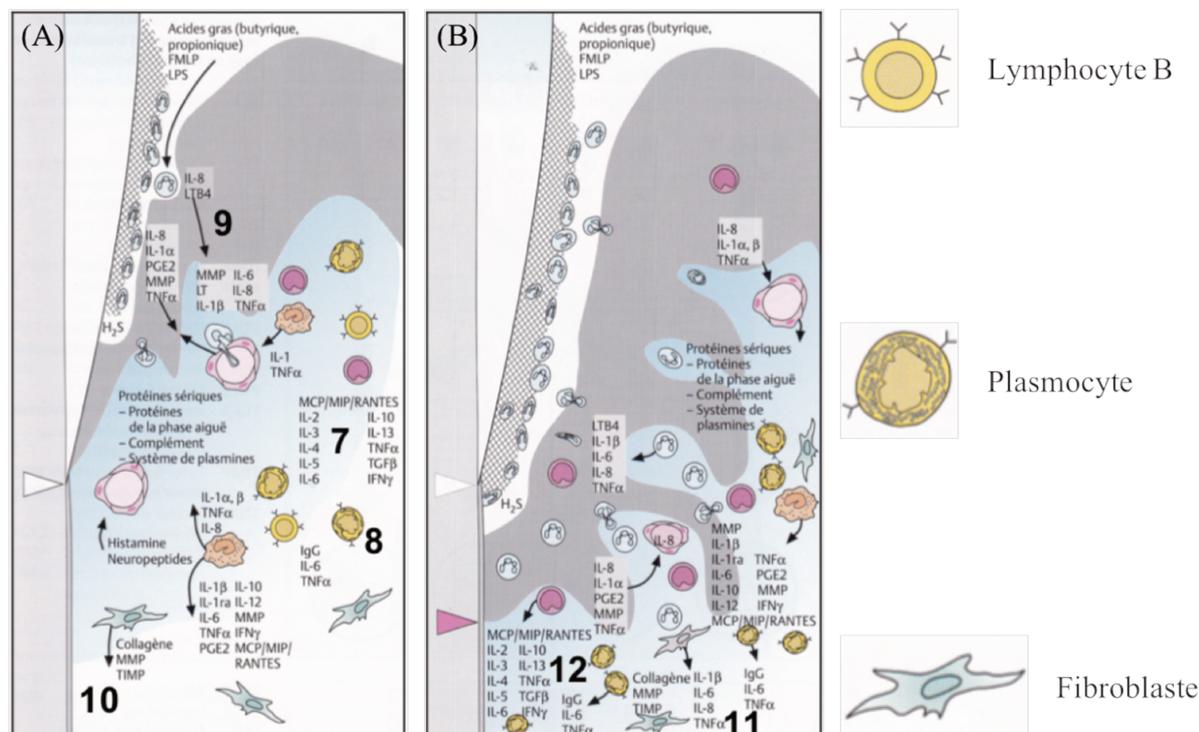
*Figure 14 : La réponse innée suite à une agression bactérienne du parodonte<sup>522</sup>.*

(A) présente la réponse immédiate à la stimulation bactérienne avec 1) synthèse des métabolites bactériens (LPS), 2) sécrétion des molécules inflammatoires (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ , la PGE2 et les MMP) par les PMN de l'épithélium de jonction et 3) dégranulation des mastocytes provoquant la libération d'histamine. (B) présente la réaction vasculaire au niveau parodontal avec 4) le passage des protéines sériques dont le Complément dans le tissu conjonctif et l'activation de la réaction inflammatoire locale, 5) le recrutement des PMN et des monocytes et 6) la production par les macrophages activés des médiateurs de l'inflammation dont des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ ), la PGE2, les MMP et des chimiokines (MCP, MIP, RANTES).

Les cellules dendritiques sont les pièces d'articulation entre la réponse innée et la réponse acquise. Les cellules dendritiques présentes sur le site atteint captent les antigènes et migrent vers les sites lymphoïdes (ganglions) où les lymphocytes seront activés. Suite à cela, une augmentation de l'infiltrat inflammatoire est observée et les lymphocytes y sont majoritaires.

Les lymphocytes T activés coordonnent la réponse immunitaire à l'aide des cytokines (IL-2 à -6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ) et les PC produisent des Ig et des cytokines. Par ailleurs, les PMN activés sécrètent des cytokines, des leucotriènes B4 (LTB4) et des MMP. Les fibroblastes activés produisent des MMP et des inhibiteurs de métalloprotéinases (TIMP) au lieu du collagène (*Figure 15.A*).

Enfin, la réaction immunitaire chronique se caractérise par la production de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), de PGE2, de MMP et de TIMP par les fibroblastes dans le tissu conjonctif infiltré. À ce stade, les PC sont les cellules majoritaires de l'infiltrat. L'homéostasie perturbée des tissus entraîne la destruction du collagène, de la matrice et de l'os, induisant le début de la perte d'attache (*Figure 15.B*).



*Figure 15 : La réponse acquise en réponse à une agression bactérienne du parodonte*<sup>522</sup>.

(A) présente la régulation de l'activité des cellules inflammatoires avec 7) la coordination de la réponse immunitaire par les lymphocytes T à l'aide des cytokines (IL-2 à -6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ ), 8) la production d'Ig et de cytokines par les plasmocytes, 9) la sécrétion de cytokines, TLB4, MMP par les PMN activés et 10) la production de MMP et de TIMP par les fibroblastes. À cette étape, l'infiltrat (fond bleu) grandit et le décollement de l'épithélium de jonction débute. (B) présente la première perte d'attache causée par 11) une production de cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ), de PGE2, de MMP et de TIMP par les fibroblastes et 12) l'invasion de l'infiltrat par les plasmocytes et leurs sécrétions de cytokines et d'Ig.

## 2. Implication des lymphocytes B et des plasmocytes dans la parodontite

Les PC semblent anormalement représentés dans les tissus parodontaux de patients atteints de parodontite. Plusieurs études ont montré que la proportion de LB et de PC augmentait en fonction de la progression, de l'activité ou de la gravité de la maladie<sup>523-525</sup>.

La progression de la maladie parodontale vers la chronicisation, voire la transition du stade de gingivite à celui de parodontite, serait associée à une forte infiltration des tissus parodontaux par de LB<sup>463,526</sup> alors que peu de leucocytes sont détectés dans une gencive saine et les LB y sont d'ailleurs sous-représentés (5%)<sup>527</sup>.

Malgré leur prédominance dans la lésion parodontale, le rôle des LB est sans doute le moins bien compris aujourd'hui de toutes les cellules immunitaires impliquées. La base de l'interaction entre les LB et les LT dans la gencive reste à définir.

Bien que des agrégats de LB et LT aient été identifiés dans la gencive de patients atteints de parodontite, il n'y a aucune preuve de la formation de centre germinatif<sup>528,529</sup>.

Ceci pourrait être dû au manque d'organisation réticulaire des cellules dendritiques<sup>530</sup> et à la présence négligeable dans les tissus parodontaux de LT CD4+ régulateurs<sup>525</sup>.

Les LB de la gencive de patients atteints de parodontite chronique expriment les molécules de co-stimulation CD80, CD83 et CD86<sup>531-533</sup>.

Cependant, aucune comparaison avec les LB issus d'un tissu gingival sain n'a été réalisée à cause de leur rareté. Cela empêche d'évaluer si les LB ont une capacité accrue de présenter l'antigène ou s'ils ont un phénotype activé dans la maladie.

Une forte implication des LB dans la pathogenèse de la parodontite viendrait de leur lien étroit avec les acteurs du remodelage du système squelettique.

Les LB activés produisent RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand), qui est un ligand intervenant dans le métabolisme osseux, fortement présent dans les lésions parodontales sous forme libre et sous forme membranaire à la surface des lymphocytes (T et B)<sup>517</sup>.

De nombreuses expériences mettent en lumière le rôle de RANKL dans la parodontite<sup>534</sup> :

- sur un modèle murin, une stimulation des LB par *Aa* augmenterait l'expression de RANKL et exacerberait la perte osseuse alvéolaire<sup>535</sup>,
- une étude montre que 90% des LB et 50 à 60% des LT exprimant RANKL dans les lésions parodontales<sup>536</sup>,
- une étude présente que, dans un modèle murin de parodontite, l'inoculation d'IL-33 associé à une infection par *Pg* augmente la proportion de LB exprimant RANKL et exacerbe la résorption osseuse<sup>537</sup>,
- à l'opposé, des souris déficientes en LB sont protégées contre la perte osseuse alvéolaire induite par *Pg*<sup>538</sup>,
- une thérapie anti-LB chez des patients présentant une PR induit une amélioration de leur état parodontal<sup>539</sup>,
- la forme soluble de RANKL, clivé par l'enzyme TACE, produite par les lymphocytes activés promeut l'ostéoclastogenèse<sup>540</sup>.

Par ailleurs, des facteurs d'activation des LB dont BAFF ont été positivement corrélées à l'atteinte parodontale consécutive à un SS<sup>541</sup>.

Cependant, des traitements anti-BAFF et anti-APRIL (un autre facteur d'activation des LB) ont permis de diminuer le nombre de LB dans les tissus gingivaux de souris « sauvages » mais pas dans ceux de souris déficientes en LB. Cela supporte l'hypothèse que les LB et leurs cytokines impliquées dans leur différenciation contribuent à la résorption osseuse parodontale<sup>536</sup>.

Concernant les PC, il a été mis en évidence qu'une commutation de classe avait lieu dans le parodonte avec une distinction préférentielle des IgG, suivies des IgA, puis des IgM<sup>542,543</sup>.

Cette production d'IgG est due à :

- l'activation des LB auto-réactifs stimulée par une exposition aux protéines PAMP exprimées par les bactéries parodontopathogènes et reconnues par les TLR des LB,
- la libération de nombreux fragments tissulaires suite à la destruction induite par les bactéries parodontopathogènes se comportant comme des néo-antigènes reconnus à tort comme appartenant au non-soi.

Il apparaît que jusqu'à 22% des PC de la gencive de patients atteints de parodontite produisent des anticorps qui reconnaissent spécifiquement *Pg*<sup>544</sup> et les titres d'anticorps sériques anti-*Pg* chez les patients atteints de parodontite sont toujours supérieurs à ceux des individus en bonne santé parodontale<sup>545-547</sup>.

Cependant, il semble que la protection humorale conférée par les anticorps anti-*Pg* soit faible. Une étude a montré que sur 18 patients présentant un taux élevé d'anticorps anti-*Pg* IgG sérique, seuls trois avaient des anticorps capables d'opsoniser *Pg* pour la phagocytose par les neutrophiles<sup>548</sup>.

De plus, il a été démontré que les gingipains produits par *Pg* détruisent efficacement les anticorps opsonisants appartenant aux sous-classes IgG1 et IgG3<sup>549</sup>.

Parallèlement à la réponse humorale antibactérienne, des titres accrus d'auto-anticorps spécifiques des composants de la matrice extracellulaire (MEC), dont le collagène de type I, la fibronectine et la laminine, ont été mis en évidence dans le sang, les tissus gingivaux atteints ou le fluide gingival des patients atteints de parodontite<sup>550</sup>.

Il est proposé que ces auto-anticorps soient impliqués dans la progression de la parodontite et contribuent à des formes plus agressives<sup>551</sup>.

Par exemple, ces auto-anticorps peuvent se lier à des fragments de collagène et former un complexe immunitaire qui va activer le Complément, recruter les PMN et stimuler des LT perpétuant ainsi la destruction parodontale<sup>534</sup>.

Enfin, des taux élevés d'auto-anticorps dirigés contre les peptides citrulinés (comme dans la PR) sont retrouvés chez les patients atteints de parodontite et le traitement de la parodontite fait significativement diminuer leur taux<sup>547,552</sup>.

Plus récemment, des auto-anticorps dirigés contre d'autres protéines du soi dont l' $\alpha$ -énolase peptide-1 ou la vimentine ont été détectés et impliqués dans la pathogénèse de la PR<sup>553</sup>.

Une hypothèse concernant la maladie parodontale reposerait sur la présence anormalement élevée de LB exprimant le marqueur membranaire CD5 (LB CD5+) dans le sang et les lésions parodontales.

Les LB CD5+ sont une sous-population de lymphocytes B-1 particulièrement impliqués dans les réactions d'auto-immunité par leur production d'anticorps<sup>554</sup> dont l'un des facteurs d'amplification est la sécrétion d'IL-10 probablement stimulée par les pathogènes parodontaux<sup>555,556</sup>.

Toutefois, les concentrations LB CD5+ ne semblent pas directement corrélées à l'évolution de la parodontite et ne diminuent pas après une thérapie parodontale.

Par ailleurs, ces cellules et EBV pourraient être impliqués dans le développement des parodontites agressives.

En effet, EBV infecte fréquemment les cellules des lésions parodontales<sup>557</sup> et les LB CD5+ infectés par EBV sécrètent beaucoup plus d'IgM et d'IgG que les LB conventionnels. Les LB CD5+ infectés EBV seraient la principale source des auto-anticorps, détectés dans les lésions parodontales, contribuant à la dégradation des tissus parodontaux<sup>534</sup>.

À ce jour peu d'études ont investigué les phénotypes de LB associées à la parodontite.

Seules 3 récentes publications éclairent sur ces associations :

- La première étude a démontré que les lymphocytes B-1a et B-2 étaient prédominants dans les lésions de parodontites chroniques et que les PC présents pouvaient se différencier à partir de ces deux types cellulaires<sup>556</sup>,
- La deuxième étude a mis en évidence que les PC étaient majoritaires dans les lésions parodontales alors que les LB mémoires prédominent dans les tissus avec gingivite ou sains<sup>525</sup>,
- La troisième étude, par un phénotype des sous types de LB dans le sang des patients présentant une parodontite sévère, a démontré une augmentation du pourcentage des LB mémoires CD27+ et une diminution des lymphocytes B1. Ces résultats démontrent une altération de la distribution des LB dans le contexte de la parodontite sévère<sup>558</sup>.

## **IX. Hypothèse d'une synergie viro-bactérienne à l'origine des parodontites : vers un nouveau paradigme en parodontologie**

### 1. Historique

Comme nous venons de le développer (cf. Introduction, Partie 3, VII.1), l'étiologie bactérienne demeure le facteur étiopathogénique majeur des maladies parodontales. Cependant, ce concept a évolué depuis les observations initiales associant bactéries et inflammation parodontale<sup>453</sup>.

Dans les années 1970, le premier concept est uniquement basé sur une association entre la présence de plaque bactérienne et la maladie (*Figure 16.A*). Il évolue au cours des années 1980 suite à des questionnements cliniques tels que :

- Pourquoi certains patients avec une grande quantité de plaque et donc une charge bactérienne importante ne développent pas ou peu de maladies parodontales ?
- Pourquoi certains patients avec une infime quantité et une faible inflammation gingivale présentent une destruction parodontale ?

Le concept évolue donc et prend désormais en compte l'hypothèse d'une réponse individuelle à la maladie (*Figure 16.B*).

A partir des années 1990, l'attention est portée sur la recherche de facteurs de risque ayant la capacité de modifier la réponse de l'hôte et de ce fait d'entraîner des changements dans l'expression de la maladie. Les observations faites montrent que les mécanismes immuno-inflammatoires de l'hôte sont activés en réponse à la détection d'éléments produits par les bactéries et que les molécules activées par la réponse de l'hôte (cytokines et les protéinases) peuvent provoquer des dommages sur les tissus de soutien de la dent.

Les mécanismes inflammatoires de la maladie parodontale sont communs à certaines maladies inflammatoires et qu'ils peuvent interagir. De plus, des prédispositions génétiques ou une modulation de l'expression génétique par les facteurs environnementaux peuvent modifier les réponses de l'hôte.

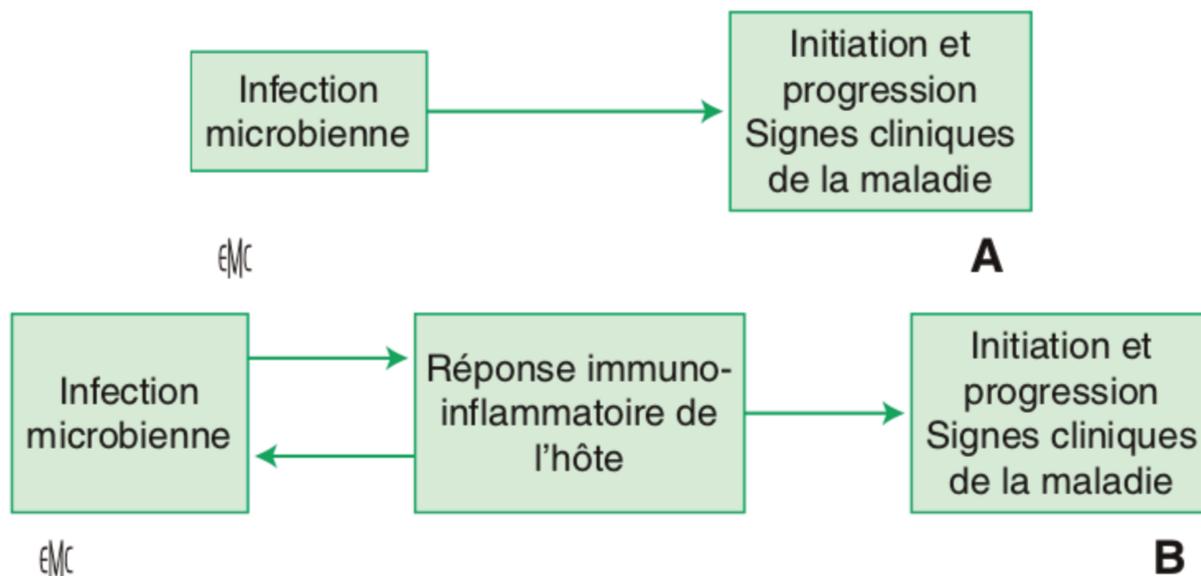


Figure 16 : Concepts de l'étiopathogénie des maladies parodontales<sup>464,559</sup>.

La Figure 16 présente l'évolutions du concept d'étiopathogénie entre les années 1970 (A) et les années 1980 (B).

Le modèle actuel implique des spécificités du complexe bactérien, des particularités génétiques de l'hôte et des facteurs environnementaux. Dans ce schéma d'interrelation, les bactéries parodontopathogènes ont la capacité d'agir sur la réponse inflammatoire de l'hôte.

En effet, les facteurs de virulence fabriqués par les complexes bactériens ont à la fois des capacités d'activation des mécanismes immuno-inflammatoires mais également de modification des modes de réponses de l'hôte à ces agents infectieux.

En retour, l'hôte répond par la synthèse d'éléments de défense ciblés ou non (PMN, peptides antimicrobiens, anticorps ...). Cette réaction s'accompagne de la synthèse par l'hôte de cytokines ayant à la fois la capacité d'influencer le comportement physiologique des tissus parodontaux mais également d'entraîner leur destruction (MMP). Chaque individu en fonction de sa variabilité génétique ou de ses facteurs environnementaux (tabac, stress ...) réagit différemment à ces produits bactériens (Figure 17)<sup>560</sup>.

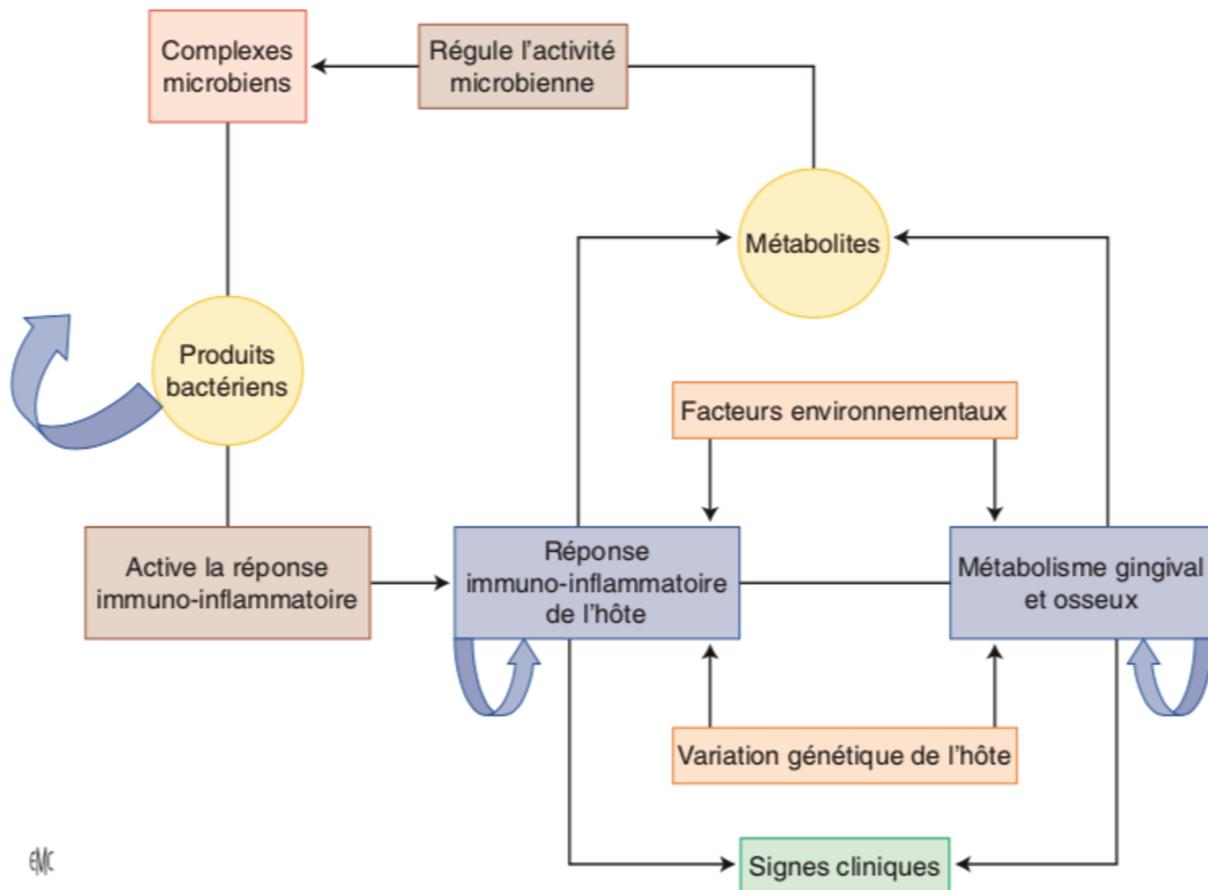


Figure 17 : Concept actuel de l'étiopathogénie des maladies parodontales<sup>64</sup>.

## 2. Limite d'un modèle étiologique uniquement bactérien

Toutefois, malgré la prise en compte de ces cofacteurs et même en contrôlant efficacement l'invasion bactérienne, l'évolution de certaines parodontites n'est pas toujours maîtrisée, suggérant que des mécanismes différents et non encore identifiés interviennent probablement dans la survenue de ces maladies.

Le concept d'une étiologie plus large des parodontites est renforcé par plusieurs observations :

- Difficulté à identifier la ou les bactéries pathogènes : Il est assez difficile d'identifier clairement, la ou les bactéries responsables de la pathologie, cette difficulté à mettre un « nom » sur, le ou les « coupables » n'est pas en faveur d'une étiologie claire liée à un agent infectieux tel que on l'entend au sens des critères de Koch ou de Hill<sup>561</sup>.

On identifie aujourd'hui plus de 1200 espèces bactériennes dans la cavité buccale, la moitié d'entre elles ne sont pas cultivables et leur rôle étiopathogénique reste obscur.

Les bactéries considérées comme hautement parodontopathogènes telles que *Pg* et *Tf* sont fréquemment isolées à partir de sites sains<sup>562</sup>. Leur présence n'est donc pas obligatoirement causale pour la maladie.

On remarque que la bactérie à gram négatif *Veillonella* est associée à une bonne santé parodontale alors que la bactérie à gram positif anaérobie *Filifactor alocis* est associée à la maladie parodontale<sup>563</sup>.

Enfin, certaines bactéries pourtant non considérées comme parodontopathogènes, telles que *Defferibacters* et *Bacteroidetes*, peuvent être également détectées et associées à la parodontite<sup>563</sup>.

- Découplage entre dysbiose et évolution clinique : Au niveau clinique, la CP évolue par alternance de phases de progression lente et de phases de progression rapide. Les parodontites agressives présentent des phases de progression rapide et prononcée et des phases de guérison spontanée. Cependant, ces phases d'évolution différentielle ne semblent pas toujours pouvoir être clairement associées à une évolution concomitante de la dysbiose bactérienne.
- Localisation des sites atteints : On peut observer des atteintes localisées à quelques dents seulement ou le fait que l'os alvéolaire soit résorbé jusqu'au tiers apical d'une dent, alors que la dent adjacente n'est pas ou très peu affectée et ce, en dépit de l'omniprésence et de la proximité des bactéries<sup>564</sup>.  
La tendance de la parodontite à se développer de façon symétrique et bilatérale par rapport à la ligne médiane reste inexplicée<sup>565</sup>.
- Absence de guérison thérapeutique : Au niveau thérapeutique, les traitements parodontaux conventionnels (tels les surfaçages radiculaires associés ou non à une antibiothérapie) permettent de stabiliser l'évolution de la parodontite mais ne permettent pas d'obtenir une guérison définitive. La persistance d'échecs thérapeutiques, malgré un traitement initial conventionnel bien mené, associé à une antibiothérapie bien ciblée, montre que des facteurs d'origine non bactérienne pourraient être à l'origine de cette réaction inflammatoire de l'hôte et que l'étiopathogénie des parodontites ainsi que les mécanismes qui favorisent la progression de la gingivite vers la parodontite ne sont pas encore totalement éclaircis<sup>566</sup>. Une conséquence immédiate est que le choix d'un traitement approprié est assez difficile<sup>567</sup>.

L'ensemble de ces éléments met en évidence que si le passage de la microflore symbiotique à une communauté pathologique dysbiotique participe clairement à la poussée inflammatoire, ce modèle ne permet pas d'expliquer en totalité la maladie. Ce modèle est destiné à évoluer<sup>568</sup>.

Il devient de moins en moins hérétique de proposer que d'autres éléments participent, à minima, en synergie avec la dysbiose pour expliquer la parodontite. Si, parmi ces éléments figurent certainement des susceptibilités individuelles (environnement, génétique, immunité ...), une hypothèse de plus en plus supportée par les données des études en cours propose que les infections virales du parodonte pourraient jouer également un rôle déterminant dans l'étiopathogénie des parodontites <sup>569-571</sup>.

### 3. EBV et parodontite

#### a. *État de la littérature*

Les herpèsvirus humains sont très présents dans la cavité orale notamment EBV (infectant plus de 95% des adultes), CMV (infectant plus de 50% des adultes) HSV-1, HHV-6 et HHV-7. Ils peuvent tous être détectés dans la salive et résident dans les muqueuses buccales saines, le tissu lymphoïde et les endothéliums. La présence quasi constante de ces virus persistants pose la question de leur rôle physiopathologique.

Nous nous attacherons ici principalement à présenter l'état de la littérature des interactions entre les herpèsvirus (notamment EBV) et la parodontite.

Selon une revue de la littérature établie par J. Slots en 2010, qui synthétise 21 études cliniques de 2000 à 2009, EBV est retrouvé dans 58% des parodontites agressives, 46% des parodontites chroniques, 20% des gingivites et 8% des sites sains<sup>566</sup>.

De cette revue de la littérature, voici quelques résultats représentatifs de la détection d'EBV :

- dans 18% des sites sains et 81% des sites avec une CP<sup>572</sup>,
- dans 89% et 46% des sites avec respectivement une parodontite agressive ou chronique
- <sup>573</sup>,
- dans 3% des sites sains et 61% des sites avec une CP<sup>574</sup>,
- dans 8% des sites sains, 55% et 46% des sites avec respectivement une parodontite agressive ou chronique<sup>575</sup>,
- dans 20% des sites avec gingivite, 33% et 47% des sites avec respectivement une parodontite agressive ou chronique<sup>576</sup>.

Une deuxième revue de la littérature établie par J. Slots en 2015, qui synthétise 20 nouvelles études cliniques de 2008 à 2013, EBV est retrouvé dans 45% des parodontites agressives, 32% des parodontites chroniques et 7% des sites sains <sup>571</sup>.

Il s'agit là de données qui illustrent la forte incidence d'EBV dans les parodontites mais qui ne fournit que des moyennes dans la mesure où la fréquence EBV varie beaucoup selon les études.

En effet, la variabilité des données s'explique certainement par la diversité des méthodologies employées et l'expertise des équipes concernant :

- le mode de prélèvement (biopsies, frottis gingival, curetage sulcus/poche, buvardage sulcus/poche ...),
- les techniques de détection EBV qui concernent les PCR (nested-PCR, PCR en temps réel, qualitative ...) et/ou la détection histologique des cellules infectées sur section (EBER, immuno-détection des antigènes ...).

Concernant les approches PCR, la présence du virus dans la salive peut représenter une limite pour l'interprétation des résultats du fait de la contamination possible du prélèvement gingival par la salive.

Les travaux de mon laboratoire, basés sur la détection des transcrits viraux qui signent l'activité du virus, montrent que EBV se réplique de manière beaucoup plus active dans tous les sites profonds (CAL > 7mm) que dans les sites modérées (CAL > 5mm) ou peu atteints (CAL > 3mm). Dans cette même étude, bien que très faibles, des signes d'expression virale ont été également détectés dans les gencives saines. De plus, dans cette étude, il a été mis en évidence que l'infection des cellules épithéliales était associée à leur apoptose ce qui suggère que la perte de l'attache épithéliale observée au cours de la parodontite pourrait être facilitée par l'infection virale<sup>13</sup>.

Concernant la relation entre EBV et la sévérité de l'atteinte parodontale, de nombreuses études mettent en évidence cette corrélation. EBV est plus fréquemment retrouvé chez les patients avec des parodontites chroniques (43,4%) que chez les donneurs sains (27,6%). EBV est significativement corrélé avec le saignement au sondage qui mesure l'activité inflammatoire de la parodontite<sup>577</sup>.

Ces données ont été depuis confirmées par diverses études dont les travaux de I. Saygun qui montrent une forte corrélation entre la charge EBV, la profondeur de poche au sondage, le niveau d'attache clinique et le saignement au sondage<sup>578</sup> et ceux de M. Chalabi qui détectent EBV dans la gencive chez 2,5% des donneurs sains, 10% des patients avec une CP modérée et 72,5% des patients avec une parodontite sévère<sup>579</sup>.

En conclusion, ces études s'accordent sur le fait que l'infection EBV est fréquente et active dans les sites atteints de parodontite. Le niveau d'infection est corrélé à la sévérité de la CP et de manière très intéressante les gencives saines sont également le siège d'une infection active à très bas bruit.

Il est à noter que EBV a souvent été souvent associé à d'autres herpèsvirus, notamment le CMV. EBV et CMV font l'objet de la majorité des recherches en virologie parodontale. CMV est également détecté dans la plaque sous-gingivale chez les patients atteints de CP.

La fréquence de détection est très variable et peut aller de 26%<sup>580</sup> à 83%<sup>576</sup>. Par ailleurs, l'ADN du CMV a été détecté dans la salive de 50% des patients atteints de parodontite, mais il est indétectable dans la salive de ceux atteints de gingivite ou chez les édentés totaux suggérant que le CMV salivaire provient surtout des sites parodontalement atteints<sup>581</sup>.

Enfin, une récente méta-analyse a mis en évidence une association significative entre la détection de EBV et la CP avec un facteur de risque de 5,74 pour les patients. Pour CMV et la CP, le facteur de risque est de 3,59 pour les patients<sup>582</sup>.

À un degré moindre, HSV-1 et HSV-2 ont fait l'objet de quelques études. HSV-1 a été retrouvé dans la plaque sous-gingivale à des niveaux très variables et allant de 13% à 100%<sup>580,583</sup>. HSV-2 a été détecté dans 15,7% à 34,6%<sup>580,584</sup>.

Concernant les conséquences de l'effet du traitement conventionnel de la parodontite sur EBV, peu d'études ont étudié l'impact du traitement non chirurgical sur la charge virale EBV dans la poche parodontale. Une étude montre que la thérapeutique initiale résulte en l'élimination de EBV à 6 mois post-traitement<sup>583</sup> et une étude plus récente rapporte que le traitement conventionnel permet une réduction du niveau d'infection EBV dans le fluide créviculaire de la poche parodontale des sites infectés chez des patients atteints de CP<sup>585</sup>.

En conclusion, il peut être noté que d'une part une proportion des herpèsvirus salivaires pourraient être produits dans la salive à partir des poches parodontales et que d'autre part le traitement parodontal réduit considérablement la charge virale salivaire<sup>586</sup> et sous-gingivale<sup>583</sup>). Le retour à une santé parodontale peut donc diminuer le risque de transmission virale entre les individus.

#### *b. La synergie viro-bactérienne*

Comme exposé ci-dessus, les données de la littérature sont en faveur d'une participation active des herpèsvirus dans la pathologie parodontale. Ces éléments ont conduit à la proposition d'un nouveau modèle physiopathologique de synergie viro-bactérienne<sup>569-571</sup>.

Ce modèle pose l'hypothèse d'une stimulation bidirectionnelle entre bactéries et virus tout au long de la parodontite (*Figure 18*). Les événements initiateurs provoquant la gingivite seraient de nature bactérienne ainsi que les modèles de gingivites expérimentales semblent le démontrer. Cet état est réversible puisque l'élimination de la plaque est nécessaire et suffisante pour restaurer un état initial « sain ».

Toutefois, le basculement vers une CP devient irréversible et semble ne plus être simplement uniquement associé à la composante bactérienne (cf. Introduction, Partie 3, IX.2.).

Dans cette situation, l'hypothèse de travail avancée est que la multiplication des herpèsvirus résidents, et tout particulièrement EBV dont nous avons décrit la présence active dans la gencive saine<sup>13</sup>, serait activé par la situation inflammatoire provoquée par la gingivite. La réactivation de ces virus latents peut survenir spontanément ou pendant les périodes de diminution des défenses de l'hôte (immunosuppression induite par des médicaments, infection concomitante, stress émotionnel prolongé, changements hormonaux, traumatisme ...).

Certains facteurs impliqués dans l'activation des herpèsvirus sont également des indicateurs de risque pour la parodontite. L'exacerbation de la multiplication virale sur le site parodontal concerné, jouerait à son tour un rôle inflammatoire susceptible d'amplifier et de maintenir une situation inflammatoire chronique avec des possibles interactions directes ou indirectes avec la dysbiose bactérienne.

Une première piste de réflexion concerne l'hypothèse que l'infection virale modifie le micro-environnement local et altère l'immunité locale. Une des conséquences serait de modifier la réponse immunitaire anti-bactérienne et favoriser la croissance des bactéries parodontopathogènes<sup>521</sup>.

Plusieurs éléments renforcent cette possibilité, les herpes peuvent altérer la fonctionnalité des cellules impliquées dans la défense de l'hôte (PMN, macrophages, lymphocytes). Les herpèsvirus utilisent des stratégies visant à réduire la défense antivirale. Pour cela, ils désintègrent les composants du complexe d'histocompatibilité, interfèrent avec la présentation de l'antigène, réduisent au silence les cellules cytotoxiques en exprimant un homologue viral de l'IL-10 et inhibent l'apoptose. Ensuite, l'activation des mécanismes impliqués dans la destruction parodontale, l'inflammation, la dégradation du collagène et la résorption osseuse peut être observées<sup>569</sup>.

Nos résultats récents (cf. Résultats, Partie 1, I.) montrent que l'infiltration de PC infectés par EBV pourrait renforcer le mécanisme immunosuppresseur compte tenu du rôle immunosuppresseur décrit pour les lymphocytes B régulateurs<sup>587,588</sup>.

Il peut aussi déclencher la libération de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires capables d'activer les ostéoclastes et les MMP<sup>589</sup>. Ces cytokines fortement retrouvées dans les sites atteints de parodontites ont été associées à un risque accru de destruction tissulaire<sup>590</sup>. De plus, la présence d'antigènes viraux intra-lésionnels est susceptible de provoquer la migration et l'activité de lymphocytes T anti-EBV qui participent très certainement à aggraver les composantes de l'infiltrat inflammatoires parodontal.

Un autre axe de travail concerne le fait que les herpèsvirus peuvent causer des effets cytopathogènes directs sur les fibroblastes, les kératinocytes, les cellules endothéliales et les cellules osseuses aboutissant à un défaut de renouvellement et de réparation tissulaire<sup>572</sup>.

Dans ce contexte, les résultats de notre équipe montrant que les cellules épithéliales du tissu jonctionnel sont infectées par EBV et sont apoptotiques renforcent la possibilité d'un rôle cytopathogène direct du virus sur la destruction des tissus parodontaux<sup>13</sup>.

Il est décrit que les virus favorisent l'adhérence et la colonisation sous-gingivale par des bactéries pathogènes grâce aux protéines virales qui constituent des récepteurs bactériens et donc de nouveaux sites d'attache pour les microorganismes<sup>591</sup>. Ces éléments pourraient favoriser la prolifération bactérienne.

En conclusion, les herpèsvirus, sont fréquemment retrouvés dans les lésions du parodonte. Ils pourraient contribuer directement à la destruction tissulaire par leurs effets cytopathogènes dirigés contre les cellules structurales et immunitaires ainsi que par leur potentialité à activer les réactions immunologiques inflammatoires destructives de l'hôte. Les virus pourraient également agir comme agent immunosuppresseur en diminuant l'activité locale des cellules immunitaires et/ou faciliter l'adhérence des parodontopathogènes sur les cellules infectées par les virus<sup>566</sup>.

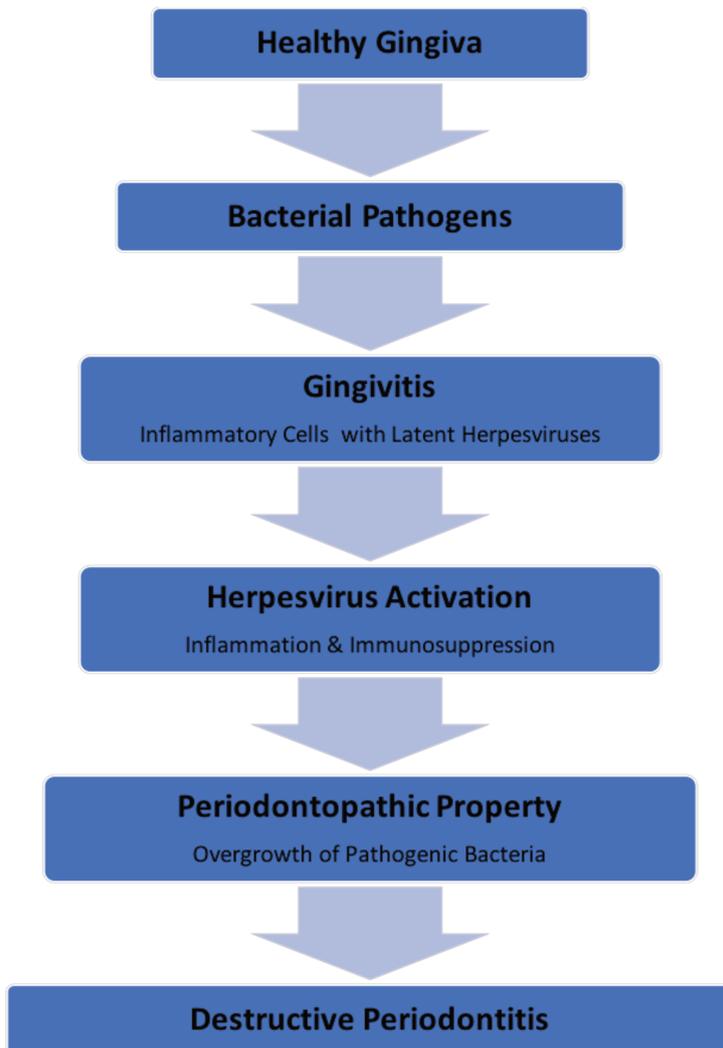


Figure 18 : Nouveau modèle de développement de la parodontite<sup>570</sup>.

Ce modèle est basé sur les réponses interactives entre herpèsvirus-bactéries-hôte. Initialement, les bactéries de la plaque induisent une gingivite qui permet aux herpèsvirus latents dans les cellules de l'hôte (ex : le LB pour EBV) de s'infiltrer et de se multiplier dans le parodonte.

# Résultats

## Partie 1 : Étude du virus Epstein-Barr dans le lichen plan oral

### I. Présentation de l'article « Epstein-Barr Virus-Infected Plasma Cells Infiltrate Erosive Oral Lichen Planus »

Comme cela a été mentionné précédemment (cf. Introduction, Partie 2.), le lichen plan oral (LPO) est un trouble inflammatoire chronique sans rémission avec une prévalence variable (0,5% à 2%) associé à une morbidité sévère et à un potentiel malin<sup>592,593</sup>.

Au niveau clinique, il présente deux formes majeures :

- le LPO érosif, douloureux, destructeur, caractérisé par des lésions buccales rouge vif et une érosion épithéliale,
- le LPO réticulaire, forme bénigne souvent asymptomatique, se présente sous la forme de papules multiples avec un réseau de lésions de dentelle blanchâtre-grise<sup>594</sup>.

EBV est un virus dont la réplication lytique est principalement orale. De plus, ce virus oncogène contribue à la pathogénèse de plusieurs maladies inflammatoires.

Ces éléments ont orienté nos travaux vers la réalisation d'une étude clinique dont l'objectif était de rechercher la présence de EBV dans une série rétrospective (n = 99) cliniquement représentatives des différents types de LPO.

Nous avons choisi de baser cette étude sur la détection in situ des cellules infectées par EBV (cellules EBV+) par hybridation in situ des EBER.

Outre une grande sensibilité et une forte spécificité, cette technique permet de pouvoir quantifier le niveau d'infection dans chaque lésion grâce au comptage du nombre de cellules infectées.

Il s'agit de la première étude de ce type publiée qui utilise cette approche et les résultats présentés dans cet article démontrent que :

- 1) l'infection par EBV est très fréquente dans le LPO, et plus particulièrement dans les formes érosives,
- 2) le niveau d'infection à EBV dans les lésions est très significativement corrélé à l'activité histologique et au caractère inflammatoire de la lésion,
- 3) les cellules infectées présentes dans les lésions sont essentiellement des PC producteurs de virus infectieux.

Ces résultats sont très originaux et apportent des éléments supplémentaires à la pathogénèse des LPO, notamment la présence de PC infectés ouvre un nouveau champ d'investigation dans la mesure où ces cellules sont maintenant considérées comme des cellules immunitaires régulatrices majeures<sup>588</sup> et fréquemment impliquées dans plusieurs maladies auto-immunes.

# Epstein-Barr Virus–Infected Plasma Cells Infiltrate Erosive Oral Lichen Planus

Journal of Dental Research  
1–7

© International & American Associations  
for Dental Research 2018  
Reprints and permissions:  
sagepub.com/journalsPermissions.nav  
DOI: 10.1177/0022034518788282  
journals.sagepub.com/home/jdr

H. Raybaud<sup>1,2\*</sup>, C.V. Olivieri<sup>1\*</sup>, L. Lupi-Pegurier<sup>1,2</sup>, S. Pagnotta<sup>3</sup>,  
R. Marsault<sup>1</sup>, N. Cardot-Leccia<sup>4</sup>, and A. Doglio<sup>1,5</sup>

## Abstract

Epstein-Barr virus (EBV), in addition to its transforming properties, contributes to the pathogenesis of several inflammatory diseases. Here, we investigated its involvement in oral lichen planus (OLP), a common autoimmune-like disease of unknown etiopathogenesis that can display a malignant potential. EBV-infected cells (EBV+ cells) were sought in a large series of clinically representative OLPs ( $n = 99$ ) through in situ hybridization to detect small noncoding EBV-encoded RNAs. Overall, our results demonstrated that EBV was commonly found in OLP (74%), with significantly higher frequency (83%) in the erosive form than in the reticular/keratinized type mild form (58%). Strikingly, many erosive OLPs were massively infiltrated by large numbers of EBV+ cells, which could represent a large part of the inflammatory infiltrate. Moreover, the number of EBV+ cells in each OLP section significantly correlated with local inflammatory parameters (OLP activity, infiltrate depth, infiltrate density), suggesting a direct relationship between EBV infection and inflammatory status. Finally, we characterized the nature of the infiltrated EBV+ cells by performing detailed immunohistochemistry profiles ( $n = 21$ ). Surprisingly, nearly all EBV+ cells detected in OLP lesions were CD138+ plasma cells (PCs) and more rarely CD20+ B cells. The presence of EBV+ PCs in erosive OLP was associated with profound changes in cytokine expression profile; notably, the expression of key inflammatory factors, such as IL1- $\beta$  and IL8, were specifically increased in OLP heavily infiltrated with EBV+ PCs. Moreover, electron microscopy–based experiments showed that EBV+ PCs actively produced EBV viral particles, suggesting possible amplification of EBV infection within the lesion. Our study thus brings conclusive evidence showing that OLP is commonly infiltrated with EBV+ PCs, adding a further puzzling element to OLP pathogenesis, given that PCs are now considered to be major regulatory immune cells involved in several autoimmune diseases (ClinicalTrials.gov NCT02276573).

**Keywords:** oral diseases, viral infection, mucosal inflammation, autoimmunity, host pathogen interactions, Herpesvirus infection

## Introduction

Oral lichen planus (OLP) is a nonremissive chronic inflammatory disorder with varying prevalence (0.5% to 2%) associated with severe morbidity and malignant potential (Nogueira et al. 2015; Aghbari et al. 2017). Clinical presentation of OLP is variable, with characteristic relapse and remission phases, and a limited number of therapies are available (Arduino et al. 2014; Gupta et al. 2017). Clinical manifestations of OLP were described in large studies (Bagan-Sebastian et al. 1992; Eisen 2002; Carbone et al. 2009), and 2 main groups are generally distinguished. Erosive OLP is painful and destructive, characterized by bright red oral lesions and epithelial erosion. In contrast, reticular OLP is a mild, often asymptomatic form that appears as multiple papules with a network of whitish-gray lacy lesions. Pathognomonic histologic OLP characteristics include the presence of a subepithelial band-like zone of cellular infiltration, appearance of vacuoles in the basal epithelial layer, and absence of epithelial dysplasia. The dense subepithelial mononuclear infiltrate in OLP is mainly composed of T cells with increased numbers of intraepithelial CD8+ cytotoxic T lymphocytes, the frequent presence of plasma cells (PCs), and a lower proportion of B cells, macrophages, and dendritic cells (Walker 1976; Jungell et al. 1989). OLP is currently

thought to be caused by an autoimmune-like mechanism mediated by cytotoxic T lymphocytes that may initiate apoptosis of adjacent epithelial cells (Walker 1976; Jungell et al. 1989; Sugerman et al. 2000; Santoro et al. 2004). However, the nature of the target antigens triggering the deregulated cytotoxic T-lymphocyte response against epithelial cells remains unknown, and the possibility that microbial infection causes OLP has been widely studied (Baek and Choi 2018).

<sup>1</sup>Université Côte d'Azur, EA 7354 MICORALIS, UFR Odontologie, Nice, France

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Pôle Odontologie, Nice, France

<sup>3</sup>Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée, Nice, France

<sup>4</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Department of Pathology, Pasteur Hospital, Nice, France

<sup>5</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Unité de Thérapie Cellulaire et Génique, Nice, France

\*Authors contributing equally to this article.

## Corresponding Author:

A. Doglio, Laboratoire MICORALIS, UFR Odontologie, Campus St Jean d'Angély, UFR Odontologie, A° des Diabes bleus, Nice 06300, France.  
Email: doglio@unice.fr

**Table 1.** Clinical Information and EBV Status.

	Clinical Status <sup>a</sup>		EBV Status <sup>b</sup>	
	Erosive	Reticular	Negative	Positive
All OLPs ( <i>n</i> = 99)	66.7 (66)	33.3 (33)	25.2 (25)	74.8 (74)
Male ( <i>n</i> = 28)	53.6 (15)	46.4 (13)	25 (7)	75 (21)
Female ( <i>n</i> = 71)	71.8 (51)	28.2 (20)	25.3 (18)	74.7 (53)
Multifocal ( <i>n</i> = 63)	63.5 (40)	36.5 (23)	28.6 (18)	71.4 (45)
Unifocal ( <i>n</i> = 36)	72.2 (26)	27.8 (10)	19.4 (7)	80.6 (29)
Gingiva ( <i>n</i> = 33)	87.9 (29)	12.1 (4)	3 (1)	97 (32)
Cheek ( <i>n</i> = 47)	51 (24)	49 (23)	30 (14)	70 (33)
Tongue ( <i>n</i> = 13)	61.5 (8)	38.5 (5)	77 (10)	23 (3)
Palate ( <i>n</i> = 4)	75 (3)	25 (1)	0	100 (4)
Lips ( <i>n</i> = 2)	100 (2)	0	0	100 (2)

Values are presented as % (*n*).

EBER-ISH, in situ hybridization of small noncoding EBV-encoded RNAs; EBV, Epstein-Barr virus; OLP, oral lichen planus.

<sup>a</sup>OLP type was diagnosed per conventional criteria.

<sup>b</sup>EBV positivity was determined with EBER-ISH-based detection of EBV+ cells in 99 OLP sections.

Several studies reported a higher prevalence of hepatitis C virus infection among patients with OLP as compared with the general population (Alaizari et al. 2016). However, significant variation in the OLP–hepatitis C virus association of patients with OLP was found depending on their geographical origin and age (Baek and Choi 2018). Human papillomavirus infection was also linked to OLP, and clonal expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with increased frequency of HPV-16-specific T cells was demonstrated among patients with OLP (Viguier et al. 2015). So far, the relationship between Epstein-Barr virus (EBV) and OLP has not been thoroughly investigated, and conflicting results have been reported. Pioneering works (Pedersen 1996) showed aberration in the humoral response to EBV of patients with OLP, suggesting a possible association. EBV frequencies in OLP, varying from 26% to 62%, were reported with qualitative polymerase chain reaction (PCR)-based EBV detection (Sand et al. 2002; Vieira Rda et al. 2016). However, the Vieira Rda et al. study found no relationship between EBV and OLP. In addition, EBV was immunohistologically detected in 35% of OLP and was statistically significant (Yildirim et al. 2011). In view of the differing reported results, the aim of our study was to detail the relationship between EBV and OLP with in situ hybridization of small noncoding EBV-encoded RNAs (EBER-ISH).

EBV is an orally transmitted virus that infects approximately 95% of the world's population (Thorley-Lawson 2015). EBV is also well recognized as a potent transforming virus, responsible for a variety of human lymphomas and oral carcinomas (Guidry et al. 2018). Moreover, EBV was recently presented as an exacerbating pathogen associated with chronic periodontitis (Vincent-Bugnas et al. 2013; Slots 2015) and several autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, systemic lupus erythematosus, and multiple sclerosis (Croia et al. 2013; Croia et al. 2014; Draborg et al. 2016; Burnard et al. 2017; Sakkas et al. 2017). Here, we bring conclusive evidence showing that the presence of EBV+

cells is a fairly common process in OLP that mainly relies on infiltration of EBV-infected plasma cells (EBV+ PCs). Interestingly, accumulation of EBV+ PCs in OLP appears to be strongly correlated with the local inflammatory condition and with the disease severity.

## Material and Methods

### Patients

Patients were referred to the oral diseases department at the Centre Hospitalier Universitaire de Nice (France) for suspected OLP between 1995 and 2015. We retrospectively selected a series of 99 representative patients with OLP (71 women, 19 to 68 y old [mean, 63.8 y]; 28 men, 24 to 83 y old [mean, 56.9]) having good quality biopsies (fixatives, available material) and informed consent. Clinical diagnosis of OLP was established per the presence of characteristic clinical lesions, exclusively reticular white lesions (*n* = 33), and erosive/ulcerative lesions (*n* = 66) with or without associated reticular lesions. Histopathologic classification according to conventional diagnostic criteria was also applied (van der Meij and van der Waal 2003). Briefly, biopsies had to show 1) superficial band-like predominantly lymphocytic inflammatory infiltrate, 2) epithelial basal cell vacuolar changes, and 3) absence of dysplasia. In addition, 22 patients diagnosed with oral lichenoid lesions (OLLs) were retrospectively included to serve as controls. Six-millimeter oral mucosal punch biopsies were collected from all patients for routine diagnosis by histologic analysis on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. For diagnostic purposes, biopsies were also collected from healthy oral mucosa surrounding the lesion. Table 1 lists the oral sites from which OLP biopsies were collected. The study protocol was approved by the local ethics committee (CPP Sud Méditerranée V) and the CNIL (Commission Nationale Informatique et Libertés), and samples were collected under collection DC-2009-1012 (Centre Hospitalier Universitaire de Nice).

### Histologic Examination and Scoring Methods

The oral biopsies were routinely processed for histologic examination after fixation in 10% buffered formalin. Paraffin-embedded tissue sections (2 μm thick) were stained with hematoxylin and eosin. All histologic evaluations were performed by 2 independent expert pathologists (N.C.L., H.R.). A 4-degree scale of histologic activity (OLP activity) was applied to each sample (0, absent; 1, light; 2, moderate; 3, severe) depending on the level of basal damage, basal cell death (Civatte body), and band-like inflammatory infiltrate intensity and the presence of epithelial cleft. In addition, histologic evaluation included an assessment of the extent of inflammatory infiltration within the submucosa (infiltrate depth), as measured from the lower limit of the epithelium by applying a 3-category scoring method: 1, infiltrate strictly limited to the underside of the basal layer, obscuring the dermoepidermal interface; 2, infiltrate involves the deep and superficial regions of the dermis; 3,

infiltrate extends in depth to the perivascular distribution. Infiltrate density was similarly assessed via 3 categories: 1, low density; 2, moderate; 3, high.

### EBV Detection and Immunohistochemical Analysis

EBV-infected cells (EBV+ cells) were detected according to EBER-ISH performed with the Dako hybridizer automated platform and Dako PNA ISH Detection Kit per the manufacturer's recommendations. A positive tissue control was treated in parallel to specimens. The level of infiltration of EBV+ cells in OLP was evaluated by counting the number of EBER-positive cells detected in each OLP section. Samples were classed into 3 arbitrarily scored groups: 0, no EBV+ cells (EBV<sup>neg</sup>); 1, <150 EBV+ cells (EBV<sup>mod</sup>); 2, >150 EBV+ cells (EBV<sup>high</sup>). Immunostaining was performed with a Dako autostainer with antigen heat retrieval induced by Dako PTlink (Dako) according to the manufacturer's recommendations. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 min). Sections were then incubated with primary antibody for 20 min at room temperature and rinsed with phosphate buffered saline. Staining was revealed by applying diaminobenzidine as chromogen and with the Envision System (Dako) per the manufacturer's recommendations. Sections were counterstained with hematoxylin. Antibodies included CD20 for B cells (clone L26; Dako/Agilent), CD3 for T cells (polyclonal rabbit; Dako/Agilent), and CD138 for PCs (clone MI15; Dako/Agilent). The number of cells per cell type was counted in serial sections from 21 selected OLPs representative of the different levels of EBV infection (i.e., 3 negative, 5 weak, 3 moderate, 10 moderate to high). The level of infiltration of each cell type was as follows: 1, <50 cells; 2, between 50 and 150 cells; 3, >150 cells.

### Electron Microscopy

Three OLP biopsies were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.4), rinsed with buffer, and then postfixed in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer). After rinsing with water, biopsies were dehydrated with acetone and embedded in Epon resin. The 80-nm ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate for observation on a JEM 1400 electron microscope operating at 100 kV and equipped with an SIS Morada camera.

### Cytokine Expression Profiling

RNA from paraffin-embedded tissues sections (2 × 20 μm) from erosive OLPs having strong infiltration of EBV+ PCs (*n* = 3) or not (*n* = 3) was purified with the RNeasy FFPE kit (Qiagen). RNA yield and quality were determined by A260/280/230 measurements (SimpliNano; GE). Analysis of gene expression was carried out with the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array: Human Cytokines and Chemokines (PAHS-150Z; Qiagen). Briefly, 175 ng of RNA was used for reverse transcription PCR reaction (RT-PCR) and then treated as follows:

DNA removal and cDNA synthesis with the RT2 First Strand kit (Qiagen), analysis of gene expression with the QuantStudio 5 PCR System (Thermo Fisher) and RT2 SYBR Green ROX qPCR Master Mix (Qiagen), and data analysis via the ΔΔCt method with RT2 Profiler PCR Array Data Analysis software (version 3.5; <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>).

### Statistical Analysis

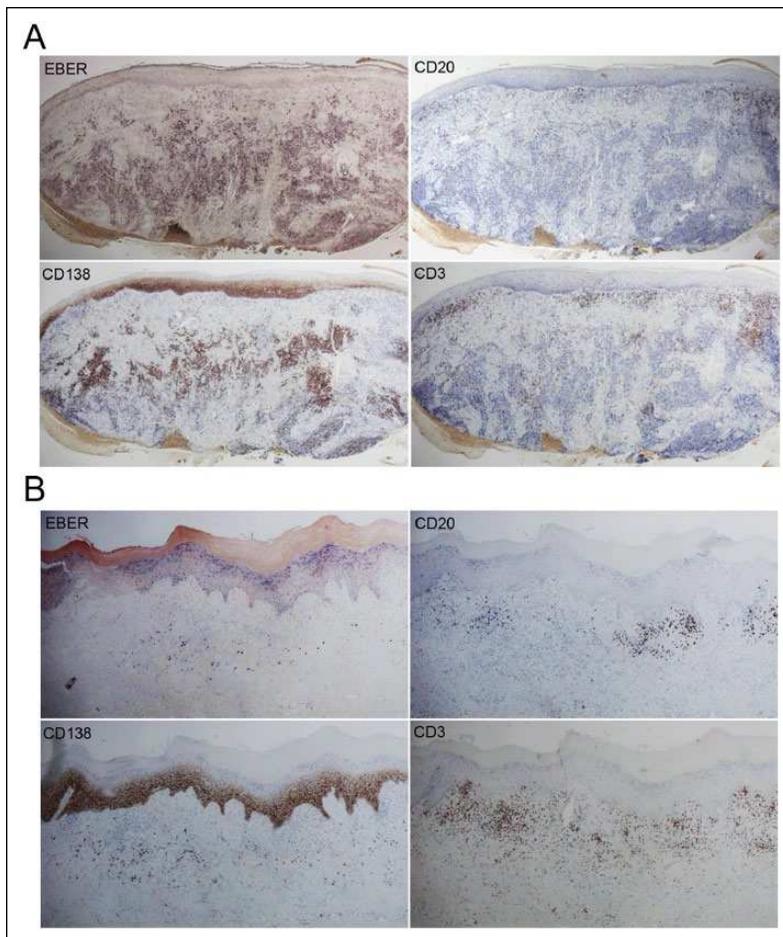
Data were expressed as the frequency of OLPs or the median of scores reflecting the level of EBV infection and inflammatory parameters. A chi-square test for percentages was used to analyze linkage among clinical OLP type, OLL, and EBV infection (*P* ≤ 0.05). Wilcoxon signed-rank test for paired samples was used to statistically compare scores for inflammatory parameters, OLP clinical type, and level of EBV infection (*n* = 99). Pearson correlation ( $\sigma$ ) was used to determine the correlation between scores for CD3+, CD20+, and CD138+ cells and EBV+ cells (*n* = 21) present in the same specimen on serial sections. Statistical analyses were performed on the BiostaTGV website (<http://marne.u707.jussieu.fr/biostatgv/>).

## Results

### EBV+ Cells Commonly Infiltrate OLP and Numbers Correlate with Disease Severity

EBER-ISH performed on 99 paraffin-embedded sections of OLP (Table 1) revealed numerous, readily detected EBV-infected cells (EBV+ cells; Fig. 1), indicating that EBV infection was quite common in OLP, ranging around 74% in our series. However, depending on the oral site from which OLP was sampled, the frequency of EBV infection varied. EBV positivity was very high in OLP in the gingiva (97%) and also quite common in cheek OLP (70%). In contrast, OLPs from the tongue were moderately infected (23%). Notably, OLPs collected from the palate and the lips were also consistently infected, although specimens were available only in small numbers. No significant relationship was found between EBV infection in OLP and patients' sex or age or presentation of OLP in the oral cavity (i.e., uni-/multifocal affection). As control, we sought EBV in OLLs (*n* = 22), since OLL is very similar to OLP but with distinguishable clinical and histologic features (Kamath et al. 2015). Although EBV was detected in OLL, EBV positivity was significantly much higher in OLP (74 of 99) than in OLL (5 of 22; *P* < 0.001) and was even notably higher in reticular OLP (19 of 33) than in OLL (5 of 22; *P* = 0.01). Moreover, control biopsies from healthy mucosa surrounding the lesion returned negative results for EBV (*n* = 10 patients; data not shown).

As the number of EBV+ cells detected in each OLP was quite variable (Fig. 1), the level of EBV infection was scored to define 3 groups: highly infected OLPs (EBV<sup>high</sup>), moderately infected OLPs (EBV<sup>mod</sup>), and uninfected OLPs (EBV<sup>neg</sup>). EBV<sup>high</sup> represented around 25% of OLPs (25 of 99); EBV+



**Figure 1.** Infiltration of EBV+ cells in OLP. EBV+ cells (EBER-ISH) were stained on serial sections prepared from formalin-fixed, paraffin-embedded OLP biopsies ( $n = 99$ ). In addition to EBER-ISH, B cells (CD20), T cells (CD3), and plasma cells (CD138) were detected in 21 randomly selected OLP serial sections. Magnification,  $\times 40$ . CD138 positivity in epithelia served as positive staining control. **(A)** Representative image showing massive infiltration of EBV+ cells in atrophic/erosive OLP (EBV<sup>high</sup> OLP). **(B)** Representative image showing moderate infiltration of EBV+ cells in reticular/keratinized OLP (EBV<sup>mod</sup> OLP). **(A, B)** Note overlap with CD138+ cells but not with CD20+ cells. EBER-ISH, in situ hybridization of small noncoding EBV-encoded RNAs; EBV, Epstein-Barr virus; OLP, oral lichen planus.

cells in these specimens appeared usually grouped to form clusters at the basis of the lesion away from the subepithelial regions and from the densest regions of the inflammatory infiltrate (Fig. 1A). Around 49% of OLPs (49 of 99) were considered moderately infected, containing low to intermediate numbers of EBV+ cells scattered throughout the lesion (Fig. 1B). Finally, no EBV+ cells were detected in 25% of our samples (25 of 99). Further investigation of the relationship between EBV and disease severity (Fig. 2A) showed that EBV infection frequency was significantly higher ( $P = 0.0001$ ) in erosive OLP (55 of 66, 83%) than in reticular OLP (19 of 33, 58%). Moreover, Pearson statistical paired-analysis indicated that the level of EBV infection strongly correlated with clinical type ( $P = 1.27 \times 10^{-11}$ ). Indeed, reticular OLPs were mainly classed as uninfected (42%) or moderately (52%) infected and only rarely as highly infected (6%), whereas erosive OLPs

were mainly moderately (48%) or highly (35%) infected. In addition, local inflammatory parameters (OLP activity, infiltrate depth, infiltrate density) were significantly associated with the level of EBV infection (Fig. 2B). Semiquantitative histologic scoring (0 to 3) of the infiltrate depth and density correlated strongly with the level of EBV infection ( $P = 1.35 \times 10^{-15}$  and  $1.25 \times 10^{-15}$ , respectively), suggesting that the extensive accumulation of infiltrated EBV+ cells at the base of the lesion may contribute to increasing the depth and density of the inflammatory infiltrate. Moreover, scores for OLP activity were significantly increased and correlated with EBV infection ( $P = 2.86 \times 10^{-7}$ ), indicating that the inflammatory conditions—in particular, depending on the level of basal damage and evidence of basal cell death (Civatte body)—worsened as EBV infection increased.

### EBV-Infected Cells in OLP Are Mainly PCs

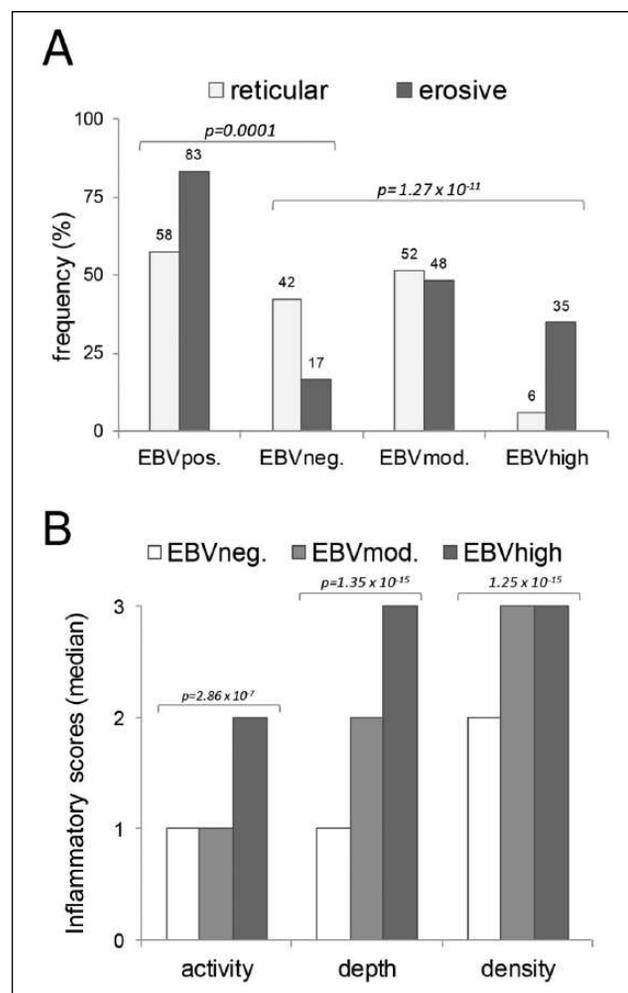
Whereas maturing B cells (CD20+) harboring latent EBV allow persistence of the virus in the body, terminally differentiated CD138+ PCs are compatible with completion of the late stages of viral replication, leading to production of viral particles. To determine the nature of the EBV+ cells present in OLP lesions, we used immunohistochemistry to detect T cells (CD3), B cells (CD20), PCs (CD138), and EBV (EBER-ISH) in serial sections from 21 specimens. EBV+ cells were rare or absent from CD20+ B-cell clusters, whereas their geographic localization almost perfectly matched that of CD138+ PCs (Figs. 1, 3A).

Detailed paired analysis between numbers of EBV+ cells and T cells, B cells, or PCs in each section (Fig. 3B) revealed a positive correlation (Pearson correlation,  $\rho = 0.962$ ,  $P = 1.7 \times 10^{-9}$ ) between the number of CD138+ PCs and EBV+ cells infiltrating the lesion, suggesting that EBV infection and PC infiltration are closely related. The number of CD20+ B cells was also weakly correlated ( $\rho = 0.45$ ,  $P = 0.04$ ) with EBV+ cells. As expected, no correlation was found between EBV and T-cell infiltration. These results indicate that EBV in OLP was mainly associated with the presence of CD138+ PCs. Because PCs are permissive for the late stage of the viral cycle, we next used electron microscopy analysis to seek EBV particles in PCs from 3 EBV<sup>high</sup> OLPs. Characteristic images of PCs harboring mature viral particles were obtained (Fig. 3C), and completion of the lytic viral cycle of EBV was observed in a small number of obviously dying cells containing high numbers of viral particles.

## Discussion

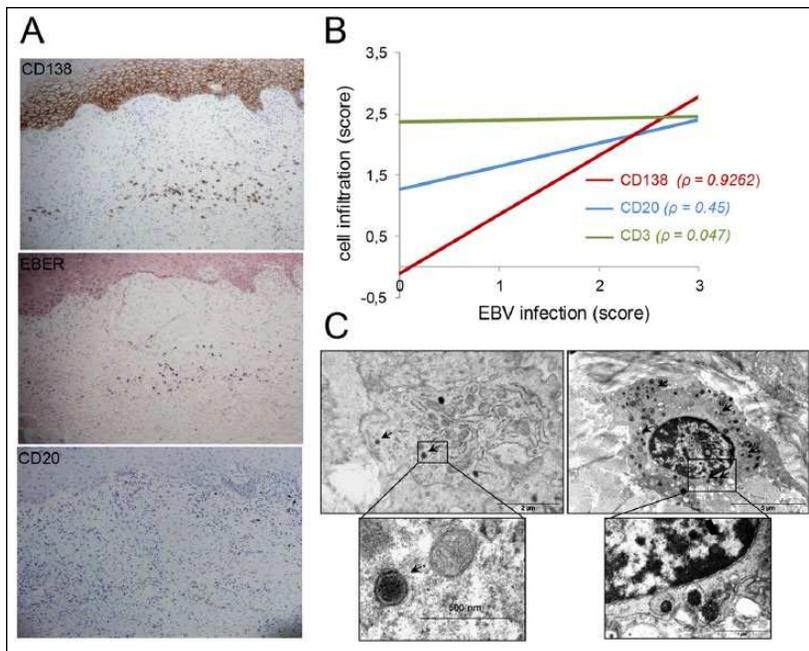
Up to now, the exact role of EBV in OLP pathogenesis has remained elusive, and its presence has generally been considered anecdotal. In the present study, we investigated the presence of EBV in a large series of clinically representative OLP with EBER-ISH, which is recognized as the gold standard to specifically detect and count EBV+ cells in fixed sections. This key methodological point allowed us to count EBV+ cells within the lesion to reliably evaluate the level of EBV infection in each specimen. Using this method, we showed for the first time that the level of EBV infection in OLP was highly correlated with local inflammatory parameters and beyond with clinical severity. Strikingly, our results show that the level of EBV infection in OLP is quite variable and significantly increases as the disease evolves. OLP shows a variety of clinical presentations with characteristic relapse and remission periods, although the disease tends to follow a chronic course with alternating acute and moderate phases. Erosive OLP—that is, the most severe form of the disease—is shown here to contain high to very high numbers of EBV+ cells. In contrast, reticular OLPs were either uninfected or moderately infected. It is thus tempting to speculate that active EBV replication in OLP may be linked to acute exacerbation of the disease and may favor relapses and evolution of lesions toward erosive forms.

Surprisingly, we observed that most EBV+ cells detected in OLP expressed CD138 and were identified as PCs. EBV is shed and transmitted in saliva, from where it infects naïve B cells (Sixbey et al. 1984; Dunmire et al. 2015). EBV persists by exploiting normal B-cell biology: it promotes B-cell activation into proliferating infected blasts; it then persists in latent form in circulating memory B cells or in association with terminal B-cell differentiation into PCs; and it can be triggered at any time, causing the release of new infectious virus (Laichalk and Thorley-Lawson 2005; Thorley-Lawson 2015). Indeed, using electronic microscopy, we showed that in OLP, EBV+ PCs were actively producing viral particles, suggesting local spreading and amplification loop of EBV infection in OLP. EBV+ PCs were previously detected in other inflammatory diseases, as in postmortem brain samples from patients with multiple sclerosis (Magliozzi et al. 2013). In rheumatoid arthritis, EBV was shown to persistently infect autoreactive PCs, which expand and differentiate in synovial ectopic lymphoid structures (ELSs; Croia et al. 2013). In Sjogren's syndrome, EBV infection was also selectively associated with PCs in ELSs of patients' salivary glands (Croia et al. 2014). Interestingly, in OLP, characteristic lymphoid follicles similar to ELSs were rare, as observed in only 5 specimens out of 99 (not illustrated). This result thus showed that in OLP, ELS formation was not required to support EBV+ PC accumulation, thereby suggesting a different mechanism than that described in rheumatoid arthritis and Sjogren's syndrome. PCs themselves are of particular interest in inflammatory pathogenesis because the autoantibodies that they secrete may play an essential role in producing the symptoms of autoimmune diseases.



**Figure 2.** EBV infection in OLP is related to disease severity and inflammatory condition. **(A)** EBER-ISH staining was performed on 99 sections from erosive ( $n = 66$ ) and reticular ( $n = 33$ ) OLPs. Specimens were grouped depending on the score corresponding to the number of EBV+ cells in each section: lack of EBV+ cells (EBV<sup>neg</sup> OLP), presence of EBV+ cells (EBV<sup>pos</sup> OLP), <150 EBV+ cells (EBV<sup>mod</sup> OLP), >150 EBV+ cells (EBV<sup>high</sup> OLP). Histograms represent the frequency with which OLPs were classified in each category, and values are indicated. Chi-square test was performed to test statistical significance of clinical type linkage to EBV infection. Wilcoxon signed-rank test for paired samples was used to compare scores of EBV infection and OLP clinical type. **(B)** EBER-ISH staining was performed on sections from 99 OLPs. Specimens were grouped according to a semiquantitative measure of the number of EBV+ cells detected in each section: absence of EBV+ cells (EBV<sup>neg</sup> OLP), <150 EBV+ cells (EBV<sup>mod</sup> OLP), >150 EBV+ cells (EBV<sup>high</sup> OLP). Inflammatory parameters representative of infiltrate depth, infiltrate density, and OLP activity were scored on a 0 to 3 scale in each specimen. Histograms represent the median value of the inflammatory scores measured in each category of OLP. Paired groups of samples were compared with Wilcoxon signed-rank test for paired samples ( $n = 99$ ). EBER-ISH, in situ hybridization of small noncoding EBV-encoded RNAs; EBV, Epstein-Barr virus; OLP, oral lichen planus.

The presence of serum autoantibodies among patients with OLP has been related to disease severity (Chang et al. 2009), and our discovery of EBV+ PC accumulation in OLP could help to explain the presence of these autoantibodies. Moreover,



**Figure 3.** Infiltrated EBV+ cells in OLP are mainly plasma cells (PCs). PCs (CD138), B cells (CD20), and EBV+ cells (EBER-ISH) were stained in 4 consecutive serial sections from 21 OLP specimens. **(A)** Representative image of overlapping between EBV infection and CD138 localization in a moderately infected OLP. **(B)** Levels of PC, B-cell, and T-cell infiltration were scored in 21 OLP specimens with a semiquantitative procedure, and correlation with the level of EBV+ infiltrated cells was determined according to Pearson correlation. Graphs represent linear correlation between each cell type and level of EBV infection. Pearson correlation coefficient ( $\sigma$ ) is indicated. **(C)** Electron microscopy analysis performed in 3 independent OLPs showing characteristic EBV particles (arrow) in PCs (left) and dying cells (right). A scale bar is indicated for each panel. EBER-ISH, in situ hybridization of small noncoding EBV-encoded RNAs; EBV, Epstein-Barr virus; OLP, oral lichen planus.

**Table 2.** Expression Profiling of Chemokines and Cytokines in EBV<sup>high</sup> and EBV<sup>neg</sup> Erosive OLPs.

Erosive OLP <sup>a</sup>	Increased <sup>b</sup>	Slightly Increased <sup>b</sup>
EBV <sup>high</sup>	CXCL1, IL1 $\beta$ , CXCL2, IL8	CCL3, CCL11, CSF3, CXCL13
EBV <sup>neg</sup>	MSTN, CCL13, CXCL10, CX3CL1, CXCL9, CCL18, IL6, CXCL16	CCL21, CXCL12, CCL19, GPI, CCL5, BMP4, TNFLGSF10, FASLG, TGF $\beta$ 2, VEGFA, CSF1, CXCL11, CCL20, CNTF, INFG

EBV, Epstein-Barr virus; OLP, oral lichen planus; PC, plasma cell.

<sup>a</sup>Six biopsies of erosive OLPs were retrospectively selected for a high level of EBV-infected PC infiltration (EBV<sup>high</sup>,  $n = 3$ ) or lack of EBV-infected PCs (EBV<sup>neg</sup>,  $n = 3$ ). Gene expression of 84 key human chemokines and cytokines was analyzed in each specimen with the RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen).

<sup>b</sup>Expression level of each gene was compared between EBV<sup>high</sup> and EBV<sup>neg</sup> conditions regarding the fold increase. Genes with a fold >3 were considered as presenting significant increased expression; genes with a fold between 1.5 and 3 were considered slightly increased.

recent studies showed that IgM+CD19+CD138<sup>hi</sup> PCs were the major B-cell subsets producing regulatory cytokines during autoimmune and infectious diseases, and subsets of PCs were identified producing either proinflammatory cytokines (e.g.,

IL-17 and GM-CSF) or anti-inflammatory cytokines (e.g., IL-10; Dang et al. 2014; Fillatreau 2015). To go further, we performed preliminary experiments aiming to characterize which immune factors could be preferentially expressed in EBV<sup>high</sup> OLP as opposed to EBV<sup>neg</sup> OLP. Using a polymerase chain reaction array for screening of 84 key human cytokines and chemokines, we showed that the expression profile of immune factors was quite different (Table 2), depending on EBV+ PC presence. In particular, EBV<sup>neg</sup> OLP was characterized by higher expression of several factors, such as CCL13, CXCL10, CX3CL1, CXCL9, CCL18, CXCL16, and, notably, IL6—well known as an inflammatory cytokine featuring pleiotropic immune activity (Unver and McAllister 2018). In contrast, EBV<sup>high</sup> OLP was associated with increased expression of major proinflammatory products (i.e., CXCL1, IL1 $\beta$ , CXCL2, and IL8). Of particular interest, IL1 $\beta$  is one of the most important mediators of the inflammatory response (Dinarello 2018), and IL8 is considered the primary cytokine involved in the recruitment of neutrophils to the site of damage or infection (Russo et al. 2014). These results indicated that the presence of EBV+ PCs was associated with profound changes in the expression profile of cytokines and chemokines in erosive OLP.

Whether EBV+ PCs may directly or indirectly promote the production of some key inflammatory factors will require further investigations. Moreover, OLP belongs to a group of autoimmune diseases characterized by damage to epithelial adhesion structures and/or inflammatory processes driven by tissue-tropic lymphocytes, resulting in specific pathology at mucosal surfaces and in the skin. Our results indicate that OLP activity, which mainly reflects damage to the basal epithelial layer, strongly correlates with levels of EBV infection. One attractive hypothesis could be that EBV plays a direct role in keratinocyte destruction during OLP, since molecular mimicry between EBV proteins and self-proteins was shown to favor autoimmune reactions (Xie and Snyder 1995). This important issue should be the focus of particular attention for future investigations.

### Author Contributions

H. Raybaud, A. Doglio, contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, drafted and critically revised the manuscript; C.V. Olivieri, N. Cardot-Leccia, contributed to conception, design, data acquisition, analysis, and interpretation, critically revised the manuscript; L. Lupi-Pegurier, contributed to conception and data analysis, critically revised the manuscript; S. Pagnotta, R. Marsault, contributed to conception,

data acquisition, and analysis, critically revised the manuscript. All authors gave final approval and agree to be accountable for all aspects of the work.

## Acknowledgments

The authors acknowledge access to facilities and equipment for all histologic and staining analyses at the Laboratoire d'Anatomie Cytologie Pathologique, CHU Nice (Pr. J.F. Michiels). The authors received financial support from the Centre Hospitalier Universitaire de Nice (AOI No. 14-AOI-02). The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

## References

- Aghbari SMH, Abushouk AI, Attia A, Elmarazy A, Menshawy A, Ahmed MS, Elsaadany BA, Ahmed EM. 2017. Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.* 68:92–102.
- Alaizari NA, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM, Tarakji B, Shugaa-Addin B. 2016. Hepatitis C virus infections in oral lichen planus: a systematic review and meta-analysis. *Aust Dent J.* 61(3):282–287.
- Arduino PG, Carbone M, Della Ferrera F, Elia A, Conrotto D, Gambino A, Comba A, Calogiuri PL, Broccoletti R. 2014. Pimecrolimus vs. tacrolimus for the topical treatment of unresponsive oral erosive lichen planus: a 8 week randomized double-blind controlled study. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 28(4):475–482.
- Baek K, Choi Y. 2018. The microbiology of oral lichen planus: is microbial infection the cause of oral lichen planus? *Mol Oral Microbiol.* 33(1):22–28.
- Bagan-Sebastian JV, Milian-Masanet MA, Penarrocha-Diago M, Jimenez Y. 1992. A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J Oral Maxillofac Surg.* 50(2):116–118.
- Burnard S, Lechner-Scott J, Scott RJ. 2017. EBV and MS: major cause, minor contribution or red-herring? *Mult Scler Relat Disord.* 16:24–30.
- Carbone M, Arduino PG, Carozzo M, Gandolfo S, Argiolas MR, Bertolusso G, Conrotto D, Pentenero M, Broccoletti R. 2009. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis.* 15(3):235–243.
- Chang JY, Chiang CP, Hsiao CK, Sun A. 2009. Significantly higher frequencies of presence of serum autoantibodies in Chinese patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 38(1):48–54.
- Croia C, Astorri E, Murray-Brown W, Willis A, Brokstad KA, Sutcliffe N, Piper K, Jonsson R, Tappuni AR, Pitzalis C, et al. 2014. Implication of Epstein-Barr virus infection in disease-specific autoreactive B cell activation in ectopic lymphoid structures of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol.* 66(9):2545–2557.
- Croia C, Serafini B, Bombardieri M, Kelly S, Humby F, Severa M, Rizzo F, Coccia EM, Migliorini P, Aloisi F, et al. 2013. Epstein-Barr virus persistence and infection of autoreactive plasma cells in synovial lymphoid structures in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 72(9):1559–1568.
- Dang VD, Hilgenberg E, Ries S, Shen P, Fillatreau S. 2014. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 28:77–83.
- Dinarello CA. 2018. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 281(1):8–27.
- Draborg A, Izarzugaza JM, Houen G. 2016. How compelling are the data for Epstein-Barr virus being a trigger for systemic lupus and other autoimmune diseases? *Curr Opin Rheumatol.* 28(4):398–404.
- Dunmire SK, Grimm JM, Schmeling DO, Balfour HH Jr, Hogquist KA. 2015. The incubation period of primary Epstein-Barr virus infection: viral dynamics and immunologic events. *PLoS Pathog.* 11(12):e1005286.
- Eisen D. 2002. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol.* 46(2):207–214.
- Fillatreau S. 2015. Regulatory plasma cells. *Curr Opin Pharmacol.* 23:1–5.
- Guidry JT, Birdwell CE, Scott RS. 2018. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of oral cancers. *Oral Dis.* 24(4):497–508.
- Gupta S, Ghosh S, Gupta S. 2017. Interventions for the management of oral lichen planus: a review of the conventional and novel therapies. *Oral Dis.* 23(8):1029–1042.
- Jungell P, Konttinen YT, Nortamo P, Malmstrom M. 1989. Immunoelectron microscopic study of distribution of T cell subsets in oral lichen planus. *Scand J Dent Res.* 97(4):361–367.
- Kamath VV, Setlur K, Yerlagudha K. 2015. Oral lichenoid lesions—a review and update. *Indian J Dermatol.* 60(1):102.
- Laichalk LL, Thorley-Lawson DA. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol.* 79(2):1296–1307.
- Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B, Chiappetta G, Veroni C, Reynolds R, Aloisi F. 2013. B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 72(1):29–41.
- Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. 2015. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *Int J Dermatol.* 54(9):1005–1010.
- Pedersen A. 1996. Abnormal EBV immune status in oral lichen planus. *Oral Dis.* 2(2):125–128.
- Russo RC, Garcia CC, Teixeira MM, Amaral FA. 2014. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 10(5):593–619.
- Sakkas LI, Daoussis D, Liossis SN, Bogdanos DP. 2017. The infectious basis of ACPA-positive rheumatoid arthritis. *Front Microbiol.* 8:1853.
- Sand LP, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. 2002. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 93(5):586–592.
- Santoro A, Majorana A, Bardellini E, Gentili F, Festa S, Sapelli P, Facchetti F. 2004. Cytotoxic molecule expression and epithelial cell apoptosis in oral and cutaneous lichen planus. *Am J Clin Pathol.* 121(5):758–764.
- Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med.* 310(19):1225–1230.
- Slots J. 2015. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol 2000.* 69(1):28–45.
- Sugerman PB, Satterwhite K, Bigby M. 2000. Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol.* 142(3):449–456.
- Thorley-Lawson DA. 2015. EBV persistence—introducing the virus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 390 Pt 1:151–209.
- Unver N, McAllister F. 2018. IL-6 family cytokines: key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 41:10–17.
- van der Meij EH, van der Waal I. 2003. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 32(9):507–512.
- Vieira Rda R, Ferreira LL, Biasoli ER, Bernabe DG, Nunes CM, Miyahara GI. 2016. Detection of Epstein-Barr virus in different sources of materials from patients with oral lichen planus: a case-control study. *J Clin Pathol.* 69(4):358–363.
- Viguier M, Bachelez H, Poirier B, Kagan J, Battistella M, Aubin F, Touze A, Carmagnat M, Frances C, Gougeon ML, et al. 2015. Peripheral and local human papillomavirus 16-specific CD8+ T-cell expansions characterize erosive oral lichen planus. *J Invest Dermatol.* 135(2):418–424.
- Vincent-Bugnas S, Vitale S, Mouline CC, Khaali W, Charbit Y, Mahler P, Precheur I, Hofman P, Maryanski JL, Doglio A. 2013. EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PLoS One.* 8(12):e80336.
- Walker DM. 1976. The inflammatory infiltrate in lichen planus lesions: an autoradiographic and ultrastructural study. *J Oral Pathol.* 5(5):277–286.
- Xie K, Snyder M. 1995. Two short autoepitopes on the nuclear dot antigen are similar to epitopes encoded by the Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5):1639–1643.
- Yildirim B, Sengucen B, Demir C. 2011. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papilloma viruses in oral lichen planus. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 16(2):e170–e174.

## II. Présence de lymphocytes T spécifiques des antigènes EBV dans le LPO

Comme indiqué dans l'article, les PC sont les cellules majoritairement présentes dans l'infiltrat inflammatoire des LPO érosifs.

Cependant, des lymphocytes T (LT) CD3<sup>+</sup> ont également été détectés plus en bordure de l'épithélium et en proportion moins importante.

De plus, les LT cytotoxiques CD8<sup>+</sup> constituent une piste probable du mécanisme auto-immunitaire causant le LPO par une apoptose des cellules épithéliales adjacentes<sup>595</sup>.

Dans ce contexte, nous avons cherché si les LT présents dans l'infiltrat pouvaient présenter une réactivité contre EBV.

Pour réaliser cette expérience, une biopsie de LPO érosif a été obtenue et dissociée par action mécanique (GentleMACS™ Dissociator, Miltenyi) et action enzymatique 0,1mg/ml de Liberase™ (Roche) et 0,1mg/ml de DNase™ (Roche) pendant 30 minutes à température ambiante.

Les cellules dissociées (principalement de type hématopoïétique) ont été mises en culture 24 h puis stimulées en présence d'agoniste du CD28 (co-facteur de stimulation des LT) soit par,

- un anticorps spécifique du récepteur T CD3 (OKT3 à 100pg/ml) pour évaluer la capacité des lymphocytes T présents dans l'extrait à proliférer en réponse à une stimulation du TCR
- un mix de peptides (1µg/ml) dérivés de différents virus et tous caractérisés pour une présentation optimale par le MHC-I (activation spécifique de CD8<sup>+</sup>) (PepMix™ MHC-I, JPT Peptides)
- un mix de plusieurs peptides (1µg/ml) spécifiques des antigènes EBV (EBNA3c, LMP2, BZLF1) (PepMix™ EBV, JPT Peptides),
- du DMSO utilisé comme contrôle négatif.

Après 6 jours de culture à 37°C, la prolifération des cellules viables CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> a été mesurée grâce à la détection intracellulaire par cytométrie en flux (FACS, fluorescence-activated cell sorting) de l'antigène nucléaire Ki67 couplé à un fluorochrome (Ki67-AF488, BD) qui est un marqueur de prolifération. L'analyse FACS permet de discriminer les cellules viables, puis les LT CD3<sup>+</sup>, puis les LT CD8<sup>+</sup> et les CD8<sup>+</sup> exprimant le Ki67 (*Figure 19.A*).

Les anticorps utilisés pour les expériences de cytométrie sont le CD3 PE-Cy7 (BD), le CD4 PE (BD), le CD8 APC (BD) et la sonde de viabilité FVS450 (BD).

Les marquages intracellulaires (Ki67) sont réalisés selon les instructions du kit Transcription Factor Buffer Set (BD). Les cellules sont ensuite analysées sur un FACS Canto II (BD).

Comme présenté ci-dessous (*Figure 19.B*), les LT CD8<sup>+</sup> de l'infiltrat inflammatoire des LPO sont fonctionnels et possèdent la capacité d'être stimulés par OKT3 (fold = 16).

Ces lymphocytes sont également capables d'être stimulés via un antigène (Condition MHC-I : fold = 4) ce qui confirme leur parfaite fonctionnalité.

Le fait majeur est que les LT CD8<sup>+</sup> de la lésion possèdent clairement une réactivité importante en réponse à l'exposition à des antigènes EBV.

En effet, la condition EBV présente un niveau de prolifération 8 fois supérieur au contrôle négatif (DMSO).

Il est essentiel de remarquer que ce niveau est seulement 2 fois inférieur à celui obtenu dans la condition CD3/OKT3.

Théoriquement, la condition CD3/OKT3 peut entraîner la stimulation de tous les LT CD8+ présents quelle que soit leur spécificité virale et peut donc être considérée comme le maximum de réactivité.

Aussi, nous pouvons émettre l'hypothèse que 50% des CD8+ présents dans l'infiltrat pourraient être spécifiques de EBV.

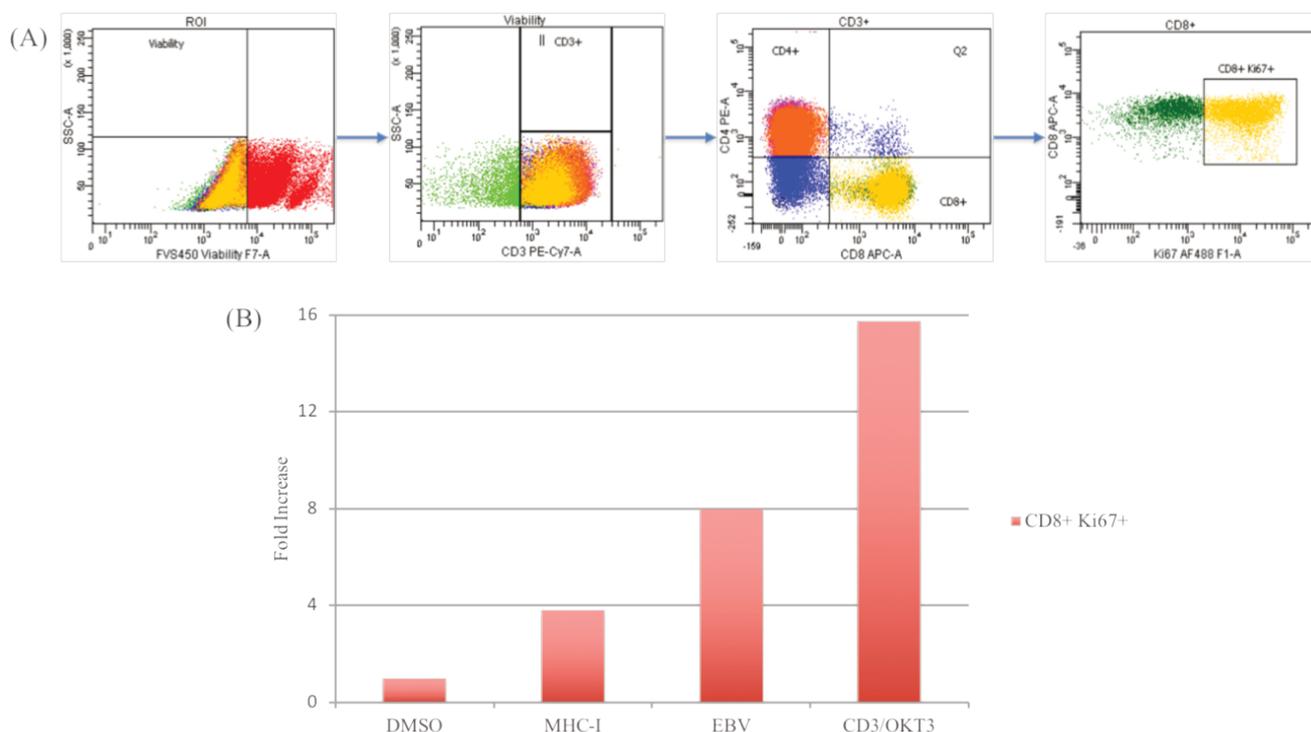


Figure 19 : Réactivité anti-EBV des LT CD8+ de l'infiltrat inflammatoire d'un LPO.

(A) présente la stratégie d'analyse par FACS avec la discrimination des lymphocytes T CD8+ en prolifération (Ki67+). (B) présente le niveau de prolifération des LT CD8+ en fonction des différentes conditions de stimulation et normalisé selon le contrôle négatif (DMSO).

En conclusion, cette étude préliminaire a mis en lumière que les LT CD8+ présents dans la lésion sont en grande partie spécifique de l'EBV.

Cette expérience est encourageante mais il est nécessaire qu'elle soit reproduite.

Malgré d'autres essais, cela n'a pas encore été possible pour deux raisons :

- les cellules récupérées après dissociation de la lésion ont présenté une quantité et une viabilité trop faibles pour pouvoir réaliser l'expérience,
- les cellules récupérées (avec une viabilité et une quantité acceptables) et mises en culture ont présenté des signes de contamination bactérienne ou fongique et ce malgré l'utilisation d'antibiotiques/antifongiques dès la récupération du prélèvement.

## Partie 2 : Étude du virus Epstein-Barr dans la parodontite chronique

### I. Résultats antérieurs

Comme il a été présenté (cf. Introduction, Partie 3, IX.3.a.), de nombreuses études par PCR ont établi que l'ADN de l'EBV est couramment associé à la parodontite chronique (CP)<sup>10,557,596-598</sup>.

Au cours du développement de la CP, la résorption de l'os alvéolaire et l'approfondissement de la fissure gingivale du sulcus conduisent à la formation d'une poche parodontale (PP) dont la profondeur est en corrélation avec la progression de la maladie.

De plus, il a été mis en évidence que la quantité d'ADN de l'EBV détectée dans les PP est en corrélation avec la gravité de la maladie<sup>557,575-577,579,596</sup>.

Cependant, la démonstration que EBV était capable de se répliquer activement dans les tissus parodontaux n'avait jamais été clairement établie et, le cas échéant, quelles cellules parodontales pouvaient être infectées et selon quels mécanismes ?

Dans ce contexte, l'équipe du Dr A. Doglio a émis l'hypothèse en 2012 que les épithéliums parodontaux qui tapissent le sulcus gingival et relient les dents à la gencive, à savoir l'épithélium sulculaire (ES) et l'épithélium jonctionnel (EJ)<sup>599,600</sup> (*Figure 9*) pourraient constituer des cibles possibles pour l'infection à l'EBV.

Dans un premier temps, il a été observé que les cellules présentes dans le liquide créviculaire gingival (LCG) sont des cellules épithéliales (CE) provenant majoritairement de l'EJ.

De plus, par hybridation *in situ* (HIS) de l'EBV (EBER-HIS) et par marquage en immunofluorescence (IF) de LMP-1 et LMP-2, il a été mis en évidence que les CE présentes dans le LCG de patients atteints de CP étaient infectées par EBV<sup>13</sup>.

Dans un second temps, les résultats d'HIS et d'IF ont été confirmés par RT-PCR en temps réel. Pour cela, la détection de l'expression de transcrits latents (LMP-1, -2, EBNA-1, -2) et lytique (BZLF1) spécifiques à EBV a été réalisée sur des échantillons de PP et de cellules épithéliales du palais (CEpal) prélevées sur un même patient atteint de CP.

À titre d'illustration, nous présentons ci-dessous quelques-uns ses principaux résultats.

Les transcrits latents de l'EBV ont été détectés par RT-PCR dans tous les échantillons de PP et comparés au niveau d'expression de ces transcrits dans des lignées cellulaires infectées ou non par l'EBV (*Figure 20*).

EBNA1 est exprimé à des niveaux similaires voire élevés à ceux mesurés dans les lignées cellulaires infectées par EBV. L'absence d'infection dans les CEpal a été mis en évidence par une absence de détection des transcrits de l'EBV.

Enfin, il a été exclu que les transcrits EBV détectés puissent provenir d'une infiltration de LB car le transcrit CD20 a seulement été détecté à un niveau très faible (*Figure 20*)<sup>13</sup>.

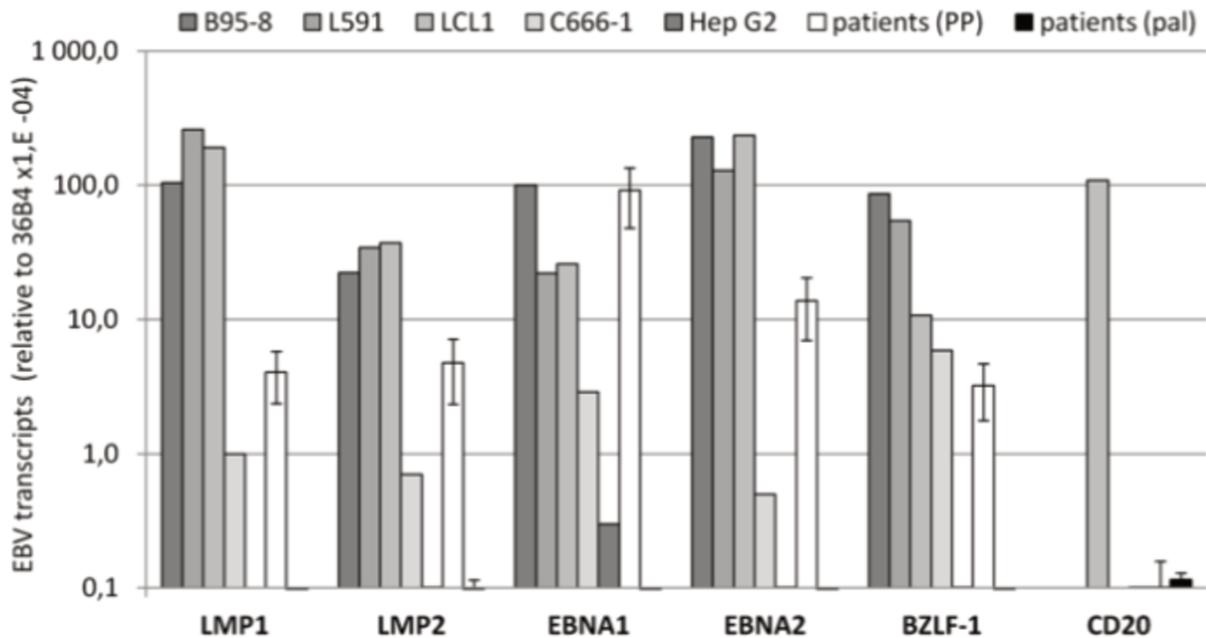


Figure 20 : Quantification de l'expression de transcrits EBV dans le matériel parodontal<sup>13</sup>. Les niveaux d'expression des transcrits latents (LMP1, LMP2, EBNA1, EBNA2) et lytique (BZLF1) de EBV sont quantifiés par RT-PCR en temps réel sur des lignées cellulaires infectées (B95-8, L591, LCL1, C666-1) ou non (HepG2, HDLM2) par EBV, sur des échantillons de PP et sur des échantillons de cellules du palais (pal) de patients présentant une CP. Les niveaux d'expression du transcrit CD20 sont également comparés entre les échantillons LCL1, PP et pal.

Ensuite, la présence de cellules épithéliales (CE) issues de la PP (CEpp) infectées par EBV a été étudiée par EBER-HIS chez 20 patients avec CP.

Pour chaque patient, deux prélèvements sont effectués. Un échantillon provient de la poche la moins profonde (shallow site, SS) et un échantillon provient de la poche la plus profonde (deep site, DS).

Cette étude est également menée sur 10 donneurs sains (healthy site, HS) avec un seul prélèvement (Figure 21).

Globalement, en analysant la fréquence des CEpp EBER positives dans les échantillons HS, SS et DS, cette étude met en évidence une corrélation positive entre le niveau d'infection EBV des CEpp et le niveau de progression de la maladie mesuré par le CAL (Figure 21.A). Cette corrélation est très significative ( $p = 0,0043$ ) comme le montre l'analyse statistique sur échantillons appariés SS et DS (Figure 21.A)<sup>13</sup>.

De plus la relation entre la sévérité de la CP et l'infection EBV a également été confirmée en comparant les niveaux d'expression de EBNA1 dans les échantillons HD, SS et DS (Figure 21.B), l'expression des transcrits EBNA1 dans les échantillons DS est significativement ( $p = 0,031$ ) plus élevée que dans les échantillons SS (Figure 21.B).

Mais aussi que les transcrits EBNA1 sont détectés dans les échantillons HS même si les niveaux d'expression sont 5 et 36 fois inférieurs à ceux obtenus dans les échantillons SS et DS respectivement (Figure 21.B)<sup>13</sup>.

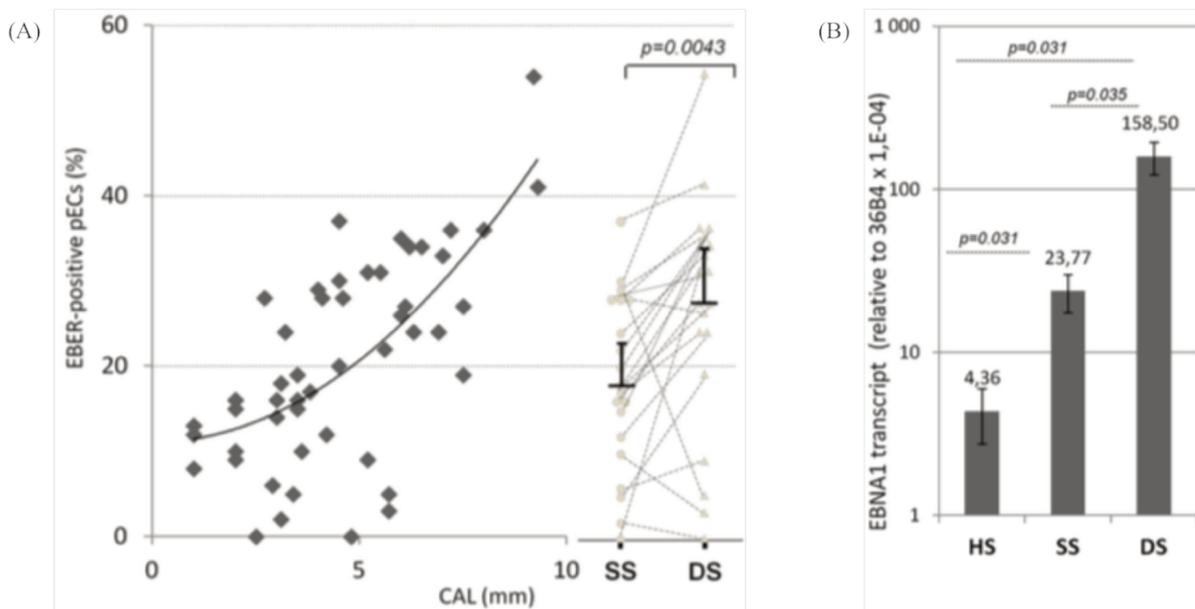


Figure 21 : Infection par l'EBV et sévérité de la parodontite chronique<sup>13</sup>.

(A ; partie gauche) présente le graphique établissant la corrélation en pourcentage de CEpp EBER positives et le CAL dans les échantillons provenant des sites sains (HS), peu profonds (SS) et profonds (DS). (A ; partie droite) montre l'analyse comparative de la fréquence des CEpp EBER positives dans des échantillons appariés (même patient) SS et DS. (B) présente les niveaux moyens d'expression du transcrit EBNA1 dans les échantillons HS, SS et DS.

Par ailleurs, cette étude a permis de mettre en évidence que les CEpp infectées par EBV produiraient des facteurs inflammatoires comme la chimiokine CCL20 et seraient significativement beaucoup plus sensibles à l'apoptose, suggérant que la perte de l'attache épithéliale observée au cours de la parodontite pourrait être facilitée par l'infection virale<sup>13</sup>.

L'ensemble de ces résultats - présentés ici pour faciliter la compréhension de la démarche globale du laboratoire - a donc principalement permis :

- de confirmer les nombreuses études antérieures établissant que l'EBV est fréquemment détecté dans les lésions parodontales et que le niveau d'infection est corrélé à la sévérité clinique évaluée par exemple par la PPS,
- de mettre en évidence pour la première fois des signes de réplication active du virus dans la PP attestée par la présence de transcrits viraux latents ou tardifs
- d'observer pour la première fois que le virus était détectable dans les CE suggérant une atteinte épithéliale directe de l'EJ au cours de la CP.

C'est sur ces bases que le laboratoire a souhaité poursuivre ses investigations concernant la description de l'infection à l'EBV au sein de la PP et qu'il m'a été demandé notamment d'envisager la mise en place d'une approche d'analyse, principalement par cytométrie en flux (FACS ; fluorescence-activated cell sorting), du contenu cellulaire de la PP et de l'infiltrat inflammatoire en relation avec l'infection EBV.

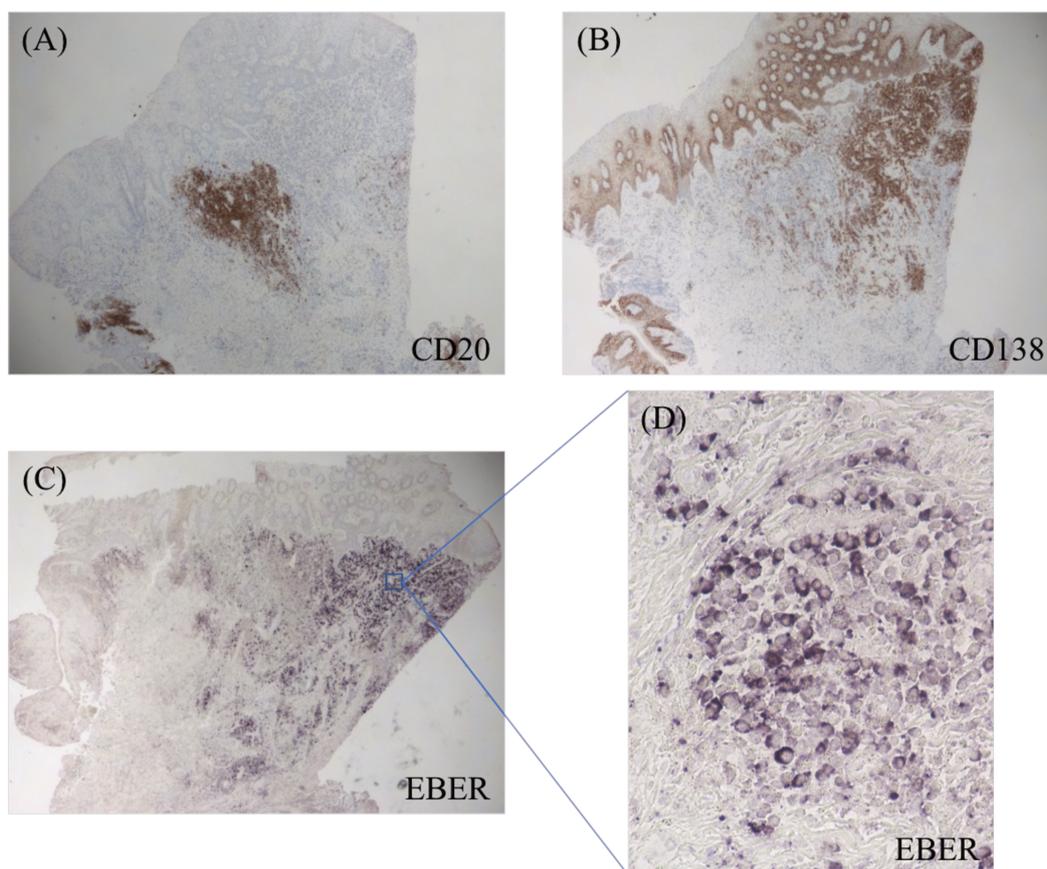
## II. Analyse de l'infiltrat inflammatoire dans la gencive avec parodontite

Les résultats obtenus sur le LPO (cf. Résultats, Partie 1, I.) mettent en évidence l'importance de la détection des PC (CD138+) infectés par EBV dans les LPO érosifs.

Je me suis donc tout naturellement intéressé, dans un premier temps, à décrire par immunohistochimie (IHC) et HIS le contenu des infiltrats en étudiant la présence et la localisation des LB (CD20+), des PC (CD138+) et des cellules infectées par EBV (EBER+).

À la suite d'interventions chirurgicales (lambeaux d'assainissement ou extractions dentaires) réalisés chez des patients présentant des stades avancés de CP, des biopsies de la crête gingivale (libre ou partiellement attachée) ont été fixées et coupées en sections fines.

Comme il est présenté (*Figure 22*), la gencive parodontale présente une quantité importante de LB CD20+ (*Figure 22.A*) mais également une importante quantité de PC CD138+ (*Figure 22.B*). Nos résultats préliminaires sont en accord avec les données de la littérature dont deux études représentatives déterminent que les PC constituent respectivement environ 32% et 39%<sup>524,601</sup> du nombre total de cellules dans les lésions parodontales. De plus, nous observons que l'infiltrat inflammatoire gingival est fortement infecté par EBV (*Figures 22.C et 22.D*) et de façon similaire aux résultats obtenus sur le LPO, la majorité des cellules infectées par EBV sont des PC (*Figure 22.B*).



*Figure 22 : Types cellulaires infectés par EBV dans la gencive atteinte de CP.*

*(A) et (B) présentent respectivement la localisation des lymphocytes B (CD20) et des plasmocytes (CD138) mise en évidence par IHC sur des sections successives de biopsies provenant d'un stade avancé de PC. (C) montre la détection et localisation des cellules infectées par EBV (EBER). (D) est un agrandissement localisé de (C) sur une zone présentant une forte densité de cellules EBV+ présentant une morphologie de plasmocytes.*

Dans un second temps, nous avons voulu confirmer ces résultats d'IHC par FACS.

En effet, l'analyse FACS permet d'analyser et de quantifier un petit nombre de cellules avec la possibilité de préciser de manière plus fine leur phénotype.

Les objectifs initiaux de cette approche étaient de parvenir à :

- un profil de l'évolution de l'invasion de l'infiltrat inflammatoire par les PC, les LB, les LT, et d'autres acteurs immunitaires en fonction de la profondeur de poche au sondage (PPS),
- de mesurer la fréquence des PC EBV+ au sein de cette population,
- de préciser si ces PC EBV+ présentaient des caractéristiques spécifiques.

Cependant, ce projet n'a pas pu encore aboutir à ce jour, principalement à cause de 2 limitations techniques à savoir :

- la difficulté que nous avons eue pour détecter le CD138 par FACS sur les cellules issues des dissociations gingivales,
- la grande difficulté à détecter par FACS les principaux marqueurs de l'EBV.

Ces éléments ont ralenti notre progression et sont discutés dans les développements suivants.

### Perte de l'expression membranaire du CD138

Les premières expériences préliminaires ont été réalisées à partir de biopsies fraîches de gencives provenant d'extractions de dents chez 6 patients avec CP présentant des PPS allant de 2 à 8mm (2, 5, 5, 7, 8 et 8mm, respectivement).

Les biopsies ont été dissociées suivant le protocole utilisé pour la dissociation du LPO (cf. Résultats, Partie 1, II.).

Le marquage pour les analyses FACS consistait à marquer les cellules avec une sonde de viabilité (7-AAD, BD) et des anticorps de surface monoclonaux-couplés à des fluorochromes dirigés contre le CD3 (APC-H7, BD), le CD19 (BB-515, BD), le CD10 (PE, BD), le CD20 (APC, BD), le CD27 (PE-Cy7, BD), le CD38 (BV510, BD) et le CD138 (BV421, BD).

Ce panel de cytométrie permet de discriminer les PC de phénotype CD10-/CD20-/CD27+/CD38+/CD138+.

La figure 23 présente la cinétique d'infiltration de la gencive par les PC CD138+ en fonction de la PPS (*Figure 23*).

Nous avons été confrontés à un résultat difficilement compréhensible dans la mesure où ces analyses ne nous ont pas permis de détecter les quantités attendues de PC CD138+. Le pourcentage de cellules phénotypées comme des PC (CD3-/CD10-/CD20-/CD27+/CD38+/CD138+) ne représentant qu'entre 0,04 et 1,15% de l'ensemble des cellules viables mesurées dans tous les prélèvements (*Figure 23.A*). De plus, ce pourcentage ne semble pas augmenter en fonction de la PPS.

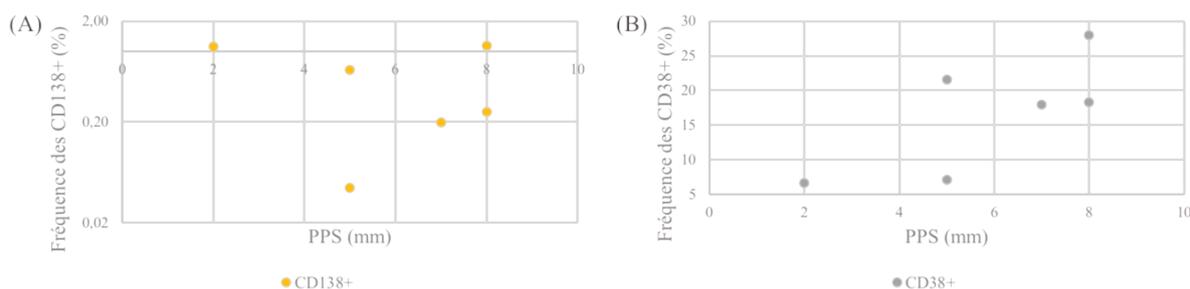
Ces résultats nous ont semblé être clairement en contradiction avec nos résultats d'IHC (*Figure 22.B*) et avec la littérature<sup>524,601</sup>, notamment l'article récent mettant en évidence, par IHC et par FACS, une proportion croissante de PC dans la lésion parodontale au cours de l'évolution de la pathologie (gencive saine, gingivite, CP sévère)<sup>525</sup>.

Toutefois, malgré le faible nombre d'échantillons encore analysés, nos résultats préliminaires sont en faveur d'une augmentation de la quantité de plasmablastes (CD3-/CD10-/CD20-/CD27+/CD38+) dans les lésions parodontales en fonction de la PPS (*Figure 23.B*).

En effet, le pourcentage de plasmablastes va de 6,6% à 28,0% pour des poches parodontales de 2mm et 8mm respectivement.

Cette augmentation semble être significative même si d'autres résultats sont nécessaires pour la confirmer.

Si l'on considère le phénotype et l'analyse FACS selon la taille et la structure de ces blastes - dont une forte proportion exprime le CD38 à haut niveau (CD38+ high) - il est probable qu'une forte proportion de ces cellules soient en fait des PC sur lesquels nous n'arrivons pas à détecter CD138. Cela nous incite à penser que la faible détection du marqueur CD138 est lié à un problème technique.



*Figure 23 : Fréquences des populations cellulaires et profondeur de la poche parodontale. (A et B) présentent les évolutions de la fréquence de détection de différentes sous-populations cellulaires dans des biopsies de gencives parodontales en fonction des profondeurs de poches des dents associées. (A) présente l'évolution de l'infiltration de la gencive par les plasmocytes (CD3-/CD10-/CD20-/CD27+/CD38+/CD138+). (B) présente celle par les plasmablastes (CD3-/CD10-/CD20-/CD27+/CD38+).*

En effet, l'analyse de la littérature nous a permis de mettre en exergue que le niveau d'expression du CD138 à la surface des PC diminuait avec le temps de manipulation ex vivo et ou de stockage par congélation<sup>602</sup>.

Dans cette étude, les auteurs observent que les niveaux CD138 sur les PC, exprimés par l'intensité médiane de fluorescence (MFI), diminuent dans les échantillons stockés pendant 6 à 24 heures à 8°C par rapport aux échantillons analysés immédiatement.

Ils trouvent que la MFI du CD138 sur des échantillons « frais » est de 242 et diminue à 4 pour les échantillons « conservés », soit un facteur 50.

Des données similaires ont été également obtenues dans d'autres études et mettent également en évidence une perte de l'expression du CD138 après congélation et décongélation<sup>603,604</sup>.

Ce phénomène, attribué à un temps de demi-vie bref en surface avec renouvellement rapide<sup>605</sup> limite le temps tolérable entre l'échantillonnage et l'analyse et réduit la sensibilité<sup>606</sup>.

Ces données nouvelles, mettant en évidence une limitation technique à l'analyse FACS des PC présents dans les lésions parodontales, nous ont conduit dans un premier temps à confirmer :

- la labilité du CD138 suite à un cycle de congélation/décongélation (datas non présentées) sur un échantillon de moelle osseuse.
- que les enzymes utilisés pour la dissociation du LPO ou de la gencive n'étaient pas responsables de la diminution du CD138 (datas non présentées) sur un échantillon de moelle osseuse fraîche.

### Difficulté à détecter les marqueurs EBV par FACS

De façon similaire, la détection de l'EBV par FACS est très peu documentée dans la littérature. Notre propre expérience montre que cela semble difficile notamment du fait qu'il n'existe pas, ou peu, d'anticorps anti-protéines virales de l'EBV (par exemple, EBNA, LMP1, Zta ...) qui aient été développés et optimisés pour une utilisation en cytométrie en flux.

La principale technique repose sur la détection par hybridation in situ des EBER avec la sonde fluorescente « EBER PNA Probe/FITC » (Y5200, Dako) et l'utilisation du kit d'amplification du signal « Alexa Fluor 488 Signal Amplification Kit » (Molecular Probes) pour augmenter et la fluorescence et la photo-stabilité<sup>607-609</sup>.

Cependant, cette technique est très complexe, longue et nécessite une maîtrise parfaite et reproductible des conditions d'hybridation in situ sur cellules en suspension.

Nous avons également réalisé sans grand succès plusieurs essais de mise au point de détection FACS de cellules infectées par EBV, en utilisant notamment divers anticorps primaires anti-EBV (LMP-1, LMP-2, EBNA-1, EBNA-2 et Zta) en les révélant avec des anticorps secondaires couplés à des fluorochromes.

Mais il est incontournable que la reproductibilité des analyses FACS est bien meilleure dans la situation d'un seul anticorps primaire directement couplé à un fluorochrome.

### La technologie « PrimeFlow™ RNA Assay » : vers une solution miracle ?

Afin de contourner ces écueils techniques, nous avons choisi d'apporter des modifications à nos protocoles d'analyses des prélèvements parodontaux pour analyse FACS.

Tout d'abord, nous avons déjà modifié le protocole de récupération et de traitement des échantillons.

Initialement, les biopsies étaient dissociées et analysées le lendemain de leur récupération (stockage à 8°C pendant au maximum 24 heures). À présent, les prélèvements sont traités dans la journée de leur extraction.

Également, nous allons dans les développements futurs mettre au point la technique du « PrimeFlow™ RNA Assay » (Thermo Fisher Scientific) pour la détection du CD138 et également celle des EBER.

Cette technique standardisée et développée initialement par Affymetrix offre des conditions optimisées d'amplification in situ d'un signal de détection d'un ARN cible (*Figure 24*).

La détection de l'ARN CD138 nous affranchira donc des problèmes de détection d'une protéine labile en surface.

Par ailleurs la technique du « PrimeFlow™ RNA Assay » (actuellement commercialisée par Thermo Fisher Scientific) a été déjà utilisée pour détecter par FACS les EBER.

Les sondes CD138 et EBER ont été précédemment mises au point par ThermoFisher mais seule la sonde CD138 a déjà fait l'objet de publications.

Le « PrimeFlow™ RNA Assay » (Figure 24) utilise un jeu de sondes oligonucléotidiques et une technologie d'amplification du signal par ADN ramifié pour analyser les transcrits d'ARN par FACS.

Cette technologie de l'ADN ramifié fournit une approche unique de la détection de l'ARN et de l'amplification du signal en amplifiant le signal rapporteur plutôt que la séquence cible dans le but d'obtenir des résultats plus cohérents que ceux obtenus à l'aide d'analyses basées sur la PCR (Figure 24.A).

Dans le « PrimeFlow™ RNA Assay », les ensembles de sondes spécifiques à la cible contiennent 20 à 40 paires d'oligonucléotides qui s'hybrident aux transcrits d'ARN cibles. L'amplification du signal est obtenue par une hybridation spécifique des paires d'oligonucléotides adjacentes à des structures d'ADN ramifié.

Les structures d'ADN ramifié sont formées par des préamplificateurs (preamplifier), des amplificateurs (amplifier) et des sondes marquées par fluorescence (fluorescently labeled probes) (Figure 24.B).

Cette technique permet d'avoir une excellente spécificité, un faible bruit de fond et un rapport signal de bruit élevé.

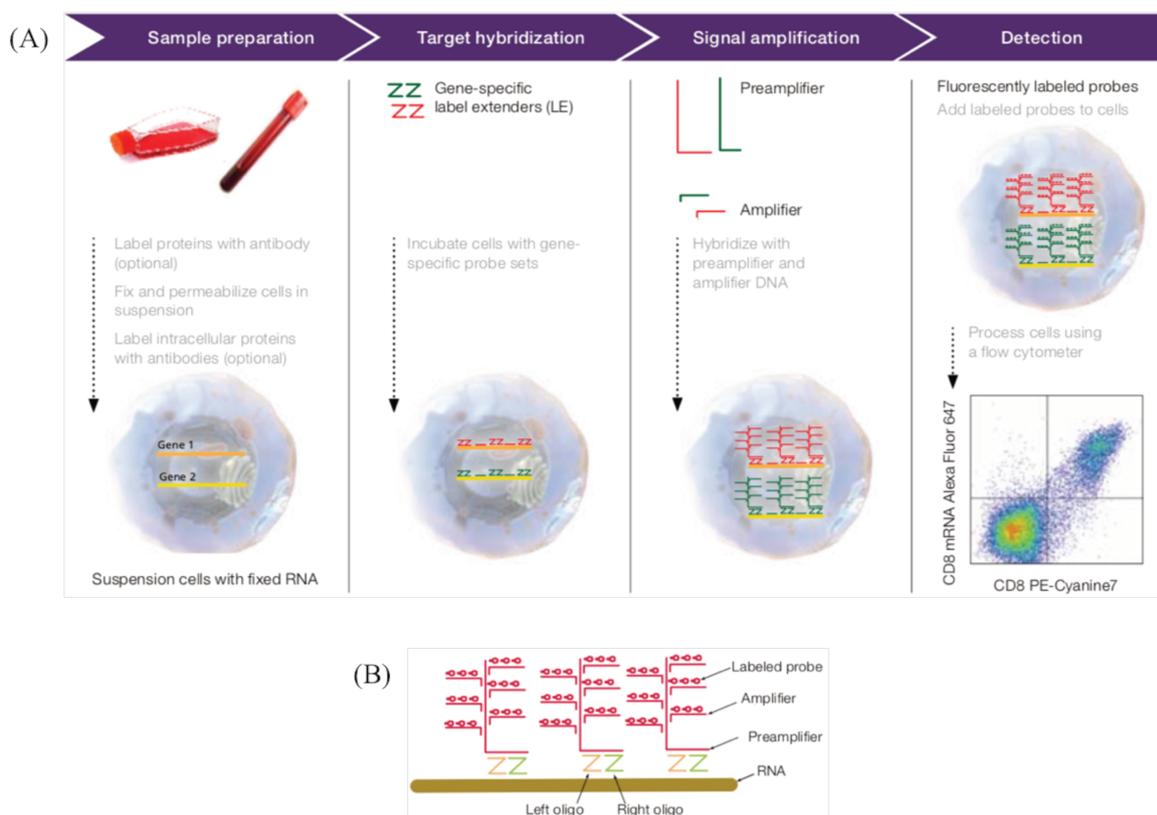


Figure 24 : PrimeFlow™ RNA Assay.

(A) présente le « workflow » de l'essai qui comporte plusieurs étapes : marquage de surface par anticorps couplé à des fluorochromes, fixation, perméabilisation, marquage intracellulaire, hybridation de la cible avec un ensemble de sondes spécifiques. (B) présente la technique d'hybridation spécifique de la cible. (ThermoFisher Scientific).

### III. Effet du traitement conventionnel de la parodontite sur la charge EBV salivaire

EBV est un virus à tropisme oral avec une charge virale salivaire (quantité d'équivalent génome de l'EBV par ml de salive) qui, chez de nombreux individus, peut être quasi-constante et élevée.

Les questions posées concernent principalement le fait de comprendre :

- comment cette production salivaire est atteinte ?
- quels sont les sites producteurs susceptibles de produire régulièrement et en quantité de nouveaux virions dans la salive ?

La biologie de l'EBV nous apprend que les principales cellules productrices de virions EBV sont les PC et les cellules épithéliales (cf. Introduction, Partie 3, IX.3.b.).

Il semble donc critique de comprendre si la production orale de l'EBV est la conséquence d'une activité plasmocytaire ou d'une atteinte épithéliale ?

Différentes études ont abordé ces questions en mesurant les cinétiques de production de nouveaux virions dans la cavité orale. Ces études ont conclu que le compartiment plasmocytaire, principalement localisé dans les amygdales, était probablement insuffisant pour expliquer en totalité la production orale du virus.

L'hypothèse d'une contribution épithéliale orale est donc fortement suspectée pour expliquer les productions virales à court terme et/ou à long terme<sup>610,611</sup>.

Comme il a été présenté, les travaux de mon laboratoire montrent que l'EBV se réplique de manière beaucoup plus active dans tous les sites profonds (CAL > 7mm) que dans les sites modérées (CAL > 5mm) ou peu atteints (CAL > 3mm) et cela tout particulièrement concerne l'infection des épithéliums du parodonte<sup>13</sup>.

La question que nous avons donc voulu aborder concerne la possibilité que l'infection des épithéliums parodontaux contribue à l'évolution de la charge virale salivaire.

À notre connaissance, personne n'a encore envisagé que le compartiment épithélial du parodonte représente une niche contribuant à la production orale du virus.

Nous avons donc cherché à observer si le traitement parodontal (élimination de la plaque dentaire et du tarte sous gingival et une sensibilisation à l'hygiène des patients) permettait de diminuer la quantité de EBV dans l'environnement parodontal du patient.

En somme, la thérapeutique initiale parodontale conventionnelle pourrait-elle diminuer la prévalence de EBV de façon globalisée - dans la salive - et de façon localisée – dans une poche parodontale – des patients atteints de CP ?

Pour répondre à cette question, nous avons réalisé une étude clinique préliminaire, au sein du département de parodontologie du CHU de Nice, sur 23 patients atteints de CP.

Lors de la première visite, les patients sont examinés et les données cliniques initiales (PI moyen, CAL moyen, PPS moyenne, PPS de la dent la plus atteinte) sont récupérées.

Deux prélèvements sont réalisés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$  :

- un prélèvement de salive (1 à 2ml),
- un prélèvement des cellules présentes dans la poche parodontale, collectées de manière non invasive par grattage à l'aide d'une curette de Gracey, de la dent la plus atteinte (PPS la plus grande).

Puis, le traitement conventionnel (grattage/surfaçage radiculaire) est réalisé.

À 3 mois après traitement, le patient est réévalué cliniquement et deux nouveaux prélèvements (salive et cellules de la poche parodontale de la même dent qu'à la première visite) sont réalisés et conservés à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

L'extraction d'ADN à partir des prélèvements (salive et poche) a été réalisée avec le « QIAamp DNA Mini Kit » (Qiagen) et la quantité EBV déterminée par PCR quantitative en utilisant le kit EBV R-gene® (Biomérieux) en suivant les indications du fabricant.

En conséquence, pour chaque patient, nous avons pu déterminer si ses 4 prélèvements sont positifs ou non pour EBV mais également avoir un suivi de la charge virale.

Les résultats des évolutions sont présentés ci-dessous (*Figure 25*)

Dans un premier temps, nous avons étudié l'évolution de la charge EBV dans la PP (*Figure 25.A*).

Les résultats à 3 mois sont :

- 22% (5/23) des patients présentent une augmentation de la charge virale,
- dans 30% (7/23) des cas, il n'y a pas d'évolution significative de la charge virale,
- 22% (5/23) des patients présentent une diminution,
- dans 26% (6/23) des cas, EBV n'est pas détecté dans les deux échantillons (visites).

Il faut préciser que les charges virales ont été considérées comme présentant une variation si les charges virales varient d'un facteur 0,316 ou 3,16.

Par exemple si la charge virale à la première visite est de 150 copies/ $\mu\text{g}$  d'ADN, elle est considérée comme présentant une augmentation si elle est de 474 ou une diminution si elle est de 47,4 à la deuxième visite.

Nous pouvons noter sur cette étude que les PPS sont en moyenne de  $7,3 \pm 1,8\text{mm}$  à la première visite et de  $5,7 \pm 2\text{mm}$  à la réévaluation.

Les PPS à la réévaluation présentent ainsi une diminution significative ( $p = 6,5 * 10^{-5}$ , test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés).

Le traitement conventionnel a donc bien été efficace localement.

Malgré cela, les données obtenues ne permettent pas de conclure si la thérapeutique a induit ou pas une diminution significative de la charge EBV dans la PP.

Cependant, la présence fréquente de l'EBV au deuxième prélèvement est tout à fait cohérente car même si la thérapeutique induit une amélioration clinique, on n'observe pas de guérison et les prélèvements sont réalisés sur des gencives encore pathologiques donc probablement toujours infectées par l'EBV.

Dans un second temps, nous avons étudié l'évolution globale du niveau d'infection au travers de l'analyse de la charge EBV salivaire (*Figure 25.B*).

Les résultats à 3 mois sont :

- 26% (6/23) des patients présentent une augmentation de la charge virale,
- dans 4% (1/23) des cas, il n'y a pas d'évolution significative de la charge virale,
- 57% (13/23) des patients présentent une diminution,
- dans 13% (3/23) des cas, EBV n'est pas détecté dans les deux échantillons (visites).

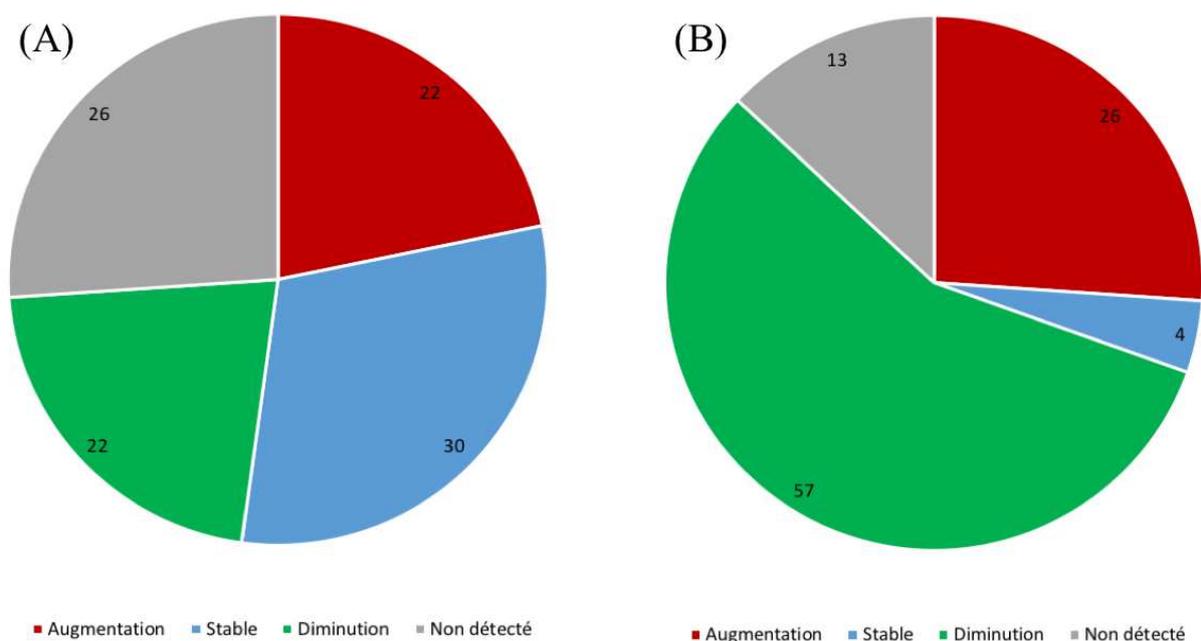
Ces données mettent en évidence que le traitement conventionnel permet d'observer en majorité une diminution de la charge salivaire EBV.

Là encore, les données ne sont pas encore significatives compte-tenu du faible échantillonnage.

Nous pouvons remarquer que la moyenne du PPS moyen (moyenne des PPS de toutes les dents pathologiques d'un même patient) est de  $5,0 \pm 1,2$ mm avant traitement et de  $3,7 \pm 0,9$  mm à la réévaluation.

Le PPS moyen présente ainsi une diminution significative ( $p = 2,4 \cdot 10^{-5}$ , test des rangs signés de Wilcoxon pour échantillons appariés).

Le traitement conventionnel permet une amélioration généralisée d'un paramètre clinique de la parodontite.



*Figure 25 : Évolutions de la charge EBV après le traitement conventionnel.*

*Les deux diagrammes présentent respectivement l'évolution de la charge virale de EBV dans les prélèvements de poches parodontales (A) et de salives (B) 3 mois après la réalisation du traitement conventionnel de la parodontite. Les termes augmentation (rouge) et diminution (vert) indiquent respectivement une augmentation (x 3,16) et une diminution (x 0,316) de la charge virale de l'EBV entre le premier prélèvement et le second prélèvement. Le terme stable (bleu) indique que les charges virales sont constantes lors des deux prélèvements. Le terme non détecté (gris) indique que EBV n'a pas été détecté dans aucun des deux prélèvements. Le nombre de patients présentant une de ces évolutions est exprimé en pourcentage de la population globale (n = 23).*

En conclusion, le traitement conventionnel semble diminuer localement (dans une poche) mais de façon non significative la production de EBV.

Toutefois, cet effet semble prendre plus d'importance au niveau global (salive).

Au niveau local comme au niveau global, l'étiologie virale est toujours présente malgré une diminution de l'étiologie bactérienne (au travers d'une diminution du PPS moyen).

Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que EBV n'a peut-être pas besoin d'une étiologie bactérienne importante pour continuer à proliférer.

Malgré une amélioration clinique, il y a toujours une inflammation qui pourrait contribuer à maintenir la réactivation EBV dans la poche parodontale.

## DISCUSSION ET PERSPECTIVES

EBV est un virus ubiquitaire chez l'homme (plus de 95% des adultes sont infectés) et présente un rôle oncogénique. EBV semble être de plus en plus impliqué dans diverses maladies inflammatoires systémiques et auto-immunes dont la SEP, la PR et le SS<sup>168,612</sup>.

Malgré son tropisme oral largement documenté, le rôle d'EBV dans les pathologies de sphère buccale reste encore assez mal connu. Sa persistance au niveau de la cavité buccale constitue pourtant un élément majeur concernant la biologie de ce virus dans la mesure où sa production salivaire assure sa dissémination dans la population et que les réactivations du virus entraînant des néo-infections orales permettent au virus de persister toute la vie dans chaque individu.

Jusqu'à présent, et en particulier avant la publication de nos travaux, le rôle d'EBV dans la pathogénèse du LPO était encore considéré comme anecdotique alors que son implication dans la pathogénèse de la CP a été plus étudiée et mieux étayée<sup>12,13,569</sup>.

Le fait que ces 2 types d'inflammations orales impliquent EBV est intéressant et suggère que les lésions inflammatoires orales sont probablement des situations propices et particulièrement favorables pour l'infection EBV.

La détection d'EBV dans les glandes salivaires de patients souffrants de SS pourrait être une autre situation associant EBV à des processus inflammatoires chroniques oraux.

La présence quasi-constante d'EBV dans la cavité orale serait-elle l'élément déterminant qui explique sa forte implication en pathogénèse orale ?

C'est probable dans la mesure où, outre la présence quasi-constante de virions infectieux dans la salive, EBV est également fréquent dans les gencives saines même en dehors d'une situation inflammatoire avérée.

Ces éléments expliquent possiblement la forte prévalence d'EBV dans les lésions parodontales et notamment dans les LPO gingivaux (> 95% dans notre étude<sup>416</sup>).

### **Partie 1 : Relation entre le lichen plan oral, EBV et les plasmocytes**

Nos travaux ont étudié la présence d'EBV dans une série (n = 99) de LPO cliniquement représentative par la mise en évidence des EBER par HIS.

Cette méthode est reconnue comme la référence absolue (gold standard) pour la détection de cellules EBV+ dans des sections fixées<sup>266,612-616</sup>.

Cela nous a permis d'évaluer par comptage des cellules EBV+ le niveau d'infection EBV dans chaque lésion.

Nous avons montré, pour la première fois, que le niveau d'infection EBV du LPO était fortement corrélé aux paramètres inflammatoires locaux et à l'évolution clinique. Ce travail met en évidence que le LPO érosif, la forme la plus inflammatoire de la maladie, est plus fortement associée à l'infection EBV que le LPO réticulaire asymptomatique, suggérant que EBV pourrait contribuer à une exacerbation de la maladie et favoriser les rechutes et l'évolution des lésions vers des formes érosives.

Le deuxième élément nouveau concerne l'infiltration de PC associée à la sévérité inflammatoire et à l'infection EBV.

En effet, nous observons que la plupart des cellules EBV+ détectées dans le LPO expriment le CD138 et sont donc identifiables comme des PC.

Ces cellules présentent un réticulum endoplasmique étendu et un cytoplasme plus large que les autres stades de maturation des cellules B afin de maintenir la production, le stockage et la sécrétion de grandes quantités d'anticorps<sup>617</sup>.

La littérature antérieure a décrit plusieurs situations où l'on observe des PC EBV+ dans des maladies inflammatoires :

- dans des échantillons de cerveau post mortem de patients atteints de SEP<sup>618</sup>,
- dans la PR, EBV infecte les PC qui se différencient dans les structures lymphoïdes ectopiques synoviales<sup>267</sup>,
- dans le SS, EBV est également associée aux PC dans les SLE secondaires dans les glandes salivaires des patients<sup>170</sup>.

### **I. Comment sont produits les plasmocytes EBV+ dans le LPO ?**

Le point intéressant, différenciant les observations réalisées dans la PR et les SS des nôtres concernant le LPO, est la faible présence de structures lymphoïdes ectopiques dans le lichen (5 sur 99 contenaient ce type de structure dans notre étude).

Cela suggère que dans le LPO, la formation d'une telle structure n'est pas nécessaire pour favoriser l'accumulation de PC EBV+ montrant ainsi un mécanisme différent de celui décrit dans la PR et le SS<sup>170,267</sup>.

La SLE constitue une entité relativement unique qui imite de nombreuses caractéristiques des follicules des cellules B et T permettant ainsi à un processus semblable à un centre germinatif de se développer.

Les données suggèrent que les SLE servent de foyer unique pour la latence EBV et la prolifération subséquente entraînant la prolifération de PC.

De telles structures facilitent probablement la croissance et la persistance EBV par la génération de cellules plasmiques.

La question qui se pose concerne donc la génération des PC dans le LPO ?

Cela est d'autant plus critique que nous observons que dans de nombreux LPO érosifs, notamment gingivaux, l'accumulation de PC infectés peut atteindre des niveaux impressionnants. Ces cellules constituant souvent l'essentiel de l'infiltrat<sup>416</sup>.

À ce stade, nous ne pouvons que formuler des hypothèses :

- les PC EBV+ sont différenciés hors des lésions, s'infiltrent et s'accumulent dans le LPO,
- des LB infectés activés par ailleurs s'accumulent dans la lésion pour s'y différencier au stade terminal,
- les LB sont directement infectés dans la lésion, sont activés, prolifèrent et différencient en PC et cela en absence d'une organisation en follicules pseudo-lymphoïdes

L'étude en microscopie électronique a mis en évidence que les PC du LPO contenaient des particules virales semblables à des particules matures.

Ces PC produisent activement des particules virales suggérant une propagation locale et une boucle d'amplification de l'infection EBV.

## II. EBV, plasmocytes et autoanticorps dans le LPO

Les LB jouent des rôles essentiels dans la réponse immunitaire, tels que la présentation de l'antigène, la production de cytokines, la mémoire et notamment la production d'anticorps.

Ces éléments se sont également révélés essentiels pour expliquer la pathogénicité des LB dans diverses maladies auto-immunes telles que le LED<sup>619</sup>, la PR<sup>620</sup>, la SEP<sup>621</sup> et le SS.

Comme preuve d'une implication des LB dans les maladies auto-immunes, le traitement immunothérapeutique permettant la déplétion ciblée des LB avec un anti-CD20 (Rituximab) a été approuvé pour le traitement de la PR et fait actuellement l'objet d'une évaluation dans le cadre d'essais cliniques en vue de son utilisation comme médication.

La même option thérapeutique est également proposée pour les patients atteints de SEP et de LED<sup>622</sup>.

La pathogénèse de maladies auto-immunes est en partie expliquée par la présence d'auto-anticorps (cf. Introduction, Partie 1, VIII.4.).

Or, les PC présentent un intérêt particulier dans le déclenchement de ces pathologies car ils peuvent produire ces auto-anticorps.

En effet, il a été exposé que les PC produisaient des auto-anticorps :

- anti-ADNdb dans le cas du LED<sup>623</sup>,
- anti-ACPA dans le cas de la PR<sup>267</sup>,
- anti-Ro52 dans le cas du SS<sup>170</sup>.

Relativement au LPO, il est intéressant de noter que la présence de divers auto-anticorps sériques a été rapporté chez les patients atteints de LPO et qu'elle semblait liée à la gravité de la maladie<sup>624-628</sup>.

L'équipe de C.P. Chiang rapporte que le sérum de 60.9% (195/320) de patients avec LPO contient des auto-anticorps spécifiques des protéines nucléaires ou mitochondriales, du muscle lisse, des cellules gastriques pariétales, de la thyroïde.

Dans ce contexte, notre découverte de l'accumulation de PC EBV+ dans les lésions pourrait aider à expliquer la présence de ces auto-anticorps.

Il semble nécessaire d'approfondir notre connaissance des PC détectés dans la lésion afin de qualifier de manière exhaustive leur capacité à produire des autoanticorps, selon quelle fréquence, de quelle nature et avec quelles spécificités.

## III. EBV, plasmocytes et cytokines dans le LPO

Les PC représentent le principal sous-ensemble de LB produisant des cytokines régulatrices au cours des maladies auto-immunes et infectieuses.

Ces cellules peuvent produire aussi bien des cytokines pro-inflammatoires (IL-17, GM-CSF ...) comme des cytokines anti-inflammatoires dont (IL-10)<sup>587,588</sup>.

Dans les pathologies auto-immunes, il a été mis en évidence que l'IL-10 joue un rôle important. Cette cytokine a été observée à des niveaux élevés dans les troubles auto-immuns<sup>629</sup> et il a été constaté que les souris dépourvues de LB producteurs d'IL-10 présentaient une PR plus sévère<sup>630</sup>. De plus, certains LT régulateurs peuvent également produire de l'IL-10 et jouer un rôle dans la régulation des réponses des cellules B auto-réactives. Il a été démontré que l'absence de ces LT régulateurs conduit à l'accumulation de lymphocytes B auto-réactifs dans le sang<sup>631</sup>.

De même, la suppression spécifique de l'IL-10 produite par les LB chez la souris entraîne un déficit en LT régulateurs ce qui induit à son tour une accumulation de LT pro-inflammatoires et une PR exacerbée<sup>632</sup>.

Concernant l'IL-10 et LPO, il n'existe pas de preuve formelle d'une possible implication physiopathologique de cette importante cytokine immunosuppressive.

Cependant, il a été observé que les cellules mononuclées et les kératinocytes de LPO généraient plus d'IL-10 que les cellules mononuclées de la gencive ou du sang périphérique en réponse à l'IL-4<sup>633</sup>.

De plus, l'ARNm IL-10 a été détecté dans les cellules mononuclées proches de la membrane basale et dans l'infiltrat des lésions de LPO<sup>434</sup>.

Enfin, des polymorphismes du gène de l'IL-10 présentent une association significative avec le LPO suggérant que les polymorphismes du gène de l'IL-10 pourraient avoir une certaine influence sur la susceptibilité à la maladie et la progression du LPO<sup>412</sup>.

Pour aller plus loin, nous avons réalisé un criblage par PCR-array de 84 cytokines et chimiokines humaines clés dans 3 LPO EBV négatifs et 3 LPO EBV positifs<sup>416</sup>.

Contrairement à ce que nous espérions, du fait de la présence importante de PC dans les LPO EBV positifs et leur absence dans les LPO EBV négatifs, nous n'avons observé aucune différence, voire même une expression quasi nulle du gène de l'IL-10 dans les 2 situations.

Cela implique que, sauf problème technique (absence de contrôle positif pour l'expression de l'IL-10), les PC EBV+ infiltrés dans le LPO ne produisent pas d'IL-10.

À ce stade, il est difficile de présenter une autre hypothèse et il serait nécessaire de reproduire ce résultat à l'aide d'autres approches techniques (IHC, PCR ciblé sur l'IL-10 ...).

Toutefois, cette approche de criblage par PCR-array a permis d'observer un certain nombre de résultats singuliers.

Les LPO EBV négatifs présentent une expression plus élevée de plusieurs facteurs, tels que CCL13, CXCL10, CX3CL1, CXCL9, CCL18, CXCL16 et notamment l'IL-6 qui est connue pour son activité immunitaire pléiotrope<sup>634</sup>.

Ce résultat est conforté par les études qui décrivent des niveaux élevés d'IL-6 dans les lésions érosives de LPO<sup>412</sup>.

Une étude a exploré le polymorphisme des gènes de l'IL-6 dans une cohorte de patients atteints de LPO et a constaté une fréquence significativement plus élevée du génotype 174 G/G de l'IL-6 chez ces patients. Cela suggère l'implication des polymorphismes géniques de l'IL-6 dans la base génétique de cette maladie<sup>410</sup>.

La raison pour laquelle les tissus lésionnels contiennent des niveaux plus élevés d'IL-6 peut s'expliquer par le fait que divers types de cellules du microenvironnement local du LPO pourraient produire des quantités importantes d'IL-6, notamment des monocytes, des LT, des macrophages, ainsi que des kératinocytes altérés.

Ce point de vue est corroboré par les conclusions selon lesquelles l'ARNm de l'IL-6 était détecté dans les LT CD4+ et CD8+ infiltrés, ainsi que dans les kératinocytes basaux et supra-basaux dans les lésions de LPO<sup>635</sup>.

Les LPO EBV positifs présentent eux une expression accrue de produits pro-inflammatoires majeurs tels que CXCL1, CXCL2, l'IL-1 $\beta$  et l'IL-8.

De manière particulièrement intéressante, l'IL-1 $\beta$  est l'un des médiateurs les plus importants de la réponse inflammatoire<sup>636</sup>.

Son association avec le LPO a été démontrée depuis longtemps et des monocytes/macrophages sécrétant l'IL-1 $\beta$  sont abondants dans les lésions de LPO<sup>637</sup>.

Cette découverte a été validée par un travail plus récent qui a révélé une expression de l'IL-1 $\beta$  dans les kératinocytes épineux et basaux et les lymphocytes infiltrés dans les lésions d'OLP<sup>638</sup>.

Dans des travaux *ex vivo*, un nombre plus important de cellules produisant l'IL-1 $\beta$  et des concentrations plus élevées d'IL-1 $\beta$  dans les isolats cellulaires fait à partir de lésions de LPO comparés à ceux réalisés à partir de tissu gingival sain ont été constatés. De plus, ces isolats, constitués de kératinocytes et cellules mononucléées et stimulés par l'IL-1 $\beta$ , produisent plus de TNF- $\alpha$  et de GM-CSF que les isolats de tissu gingival<sup>633,639</sup>.

Ces observations suggèrent ainsi une place importante de l'IL-1 $\beta$  dans le réseau de cytokines impliqué dans la pathogenèse du LPO.

Par ailleurs, l'IL-8 est considérée comme la cytokine primaire impliquée dans le recrutement de neutrophiles sur le site du dommage ou de l'infection<sup>640</sup>. À notre connaissance, l'IL-8 n'a jamais été détecté dans les lésions de LPO.

Cependant, au moins deux études ont montré un niveau élevé d'IL-8 dans le sérum et la salive de patients avec LPO<sup>641,642</sup>.

Cette disparité entre les tissus lésionnels et le sérum indique que l'IL-8 pourrait principalement fonctionner dans la réponse immunitaire systématique plutôt que localement au niveau des lésions.

En outre, le taux sérique anormal d'IL-8 pouvant être détecté chez les patients avec un LPO permet d'en faire un marqueur sensible dans le suivi de l'activité du LPO et des effets thérapeutiques<sup>643</sup>.

Enfin, une étude met en lumière que les niveaux salivaires d'IL-8 augmentent lors du passage de la forme réticulée à la forme érosive ce qui suggère qu'un test de détection de l'IL-8 salivaire pourrait être un biomarqueur prometteur de la sévérité du LPO<sup>644</sup>.

Bien entendu, l'implication de nombreuses autres cytokines est possible et largement décrite dans des études antérieures. Elles mettent en évidence des schémas d'expression anormaux de diverses cytokines liées à l'inflammation dans les lésions, la salive, le sérum et le sang des patients atteints de LPO mais aussi présentent que des polymorphismes géniques de plusieurs cytokines peuvent être impliqués dans la susceptibilité du LPO<sup>645</sup>.

Nos résultats mettent en évidence des profils d'expression des cytokines et des chimiokines différents entre des LPO érosifs avec ou sans PC EBV+.

La question de savoir si les PC EBV+ peuvent directement ou indirectement promouvoir la production de certains facteurs inflammatoires clés nécessitera des investigations complémentaires.

Des recherches supplémentaires sur les rôles exacts de ces cytokines aideront à la compréhension de la pathogenèse et à l'identification de nouvelles approches thérapeutiques du LPO.

## Partie 2 : Relation entre la parodontite chronique, EBV et les plasmocytes

Nos travaux antérieurs apportent un certain nombre d'éléments nouveaux concernant l'implication d'EBV dans la CP :

- L'infection EBV dans les lésions parodontales est très fréquente et est associée à une aggravation de la sévérité des lésions.
- Nos résultats préliminaires d'IHC révèlent que les PC pourraient être le type cellulaire majoritairement infecté par EBV au cours de la CP.
- Les cellules épithéliales du parodonte peuvent être infectées et la production du virus par ces cellules pourrait faciliter la perte de l'attache épithéliale au cours des parodontites et contribuer aussi à la production de virus salivaires.

Une partie de ces résultats fait écho à ceux que nous avons obtenus dans le LPO et à la littérature impliquant les PC EBV+ dans des pathologies inflammatoires<sup>170,267,618</sup>.

Malgré leur abondance dans les lésions parodontales<sup>556,646</sup>, le rôle des LB et des PC au cours de l'inflammation parodontale reste encore aujourd'hui peu étudié et donc incomplètement caractérisé.

Cependant, il semble que ces cellules jouent un double rôle en étant à la fois protectrices, en facilitant la clairance des bactéries et destructrices en favorisant l'inflammation, la résorption osseuse et la dissolution de la matrice extracellulaire<sup>534,555</sup>.

Il est intéressant de rapporter que le rôle des LB dans la pathogenèse de la maladie parodontale a récemment été renforcé par des études montrant que la déplétion en cellules B conduisait à une amélioration des paramètres parodontaux<sup>538,539,647</sup>.

Nous avançons comme hypothèse de travail que l'évolution du phénotype des cellules B détectées dans la lésion parodontale joue un rôle au cours de la progression de la maladie. Notamment l'accumulation de PC, ou autrement dit l'activation des LB aboutissant à la différenciation terminale des LB, constituerait un marqueur d'aggravation de la pathologie. La question critique est de comprendre dans ce schéma la place d'EBV :

- EBV est-il le « trigger » de l'accumulation de B matures dans la lésion ?
- EBV est-il un agent opportuniste qui tire profit de la situation pour se multiplier, contribuant, sans doute également de par sa présence, à aggraver la situation inflammatoire ?

À ce stade, des difficultés techniques nous ont empêché de détecter CD138 et EBV directement par analyse FACS (cf. Résultats, Partie 2, II.) et de pouvoir conclure, au moins sur un petit nombre de prélèvements, sur le lien qu'il pourrait exister entre la densité intra-lésionnelle en PC et la sévérité de la maladie (PPS).

Cependant, nos résultats préliminaires exposent une tendance favorable entre l'invasion de la lésion par les plasmablastes en corrélation avec la PPS.

Ces résultats, qui doivent être confirmés, sont en corrélation avec la littérature et notamment l'article récent mettant en évidence par IHC et par FACS, une proportion croissante de PC dans la lésion parodontale au cours de l'évolution de la pathologie (gencive saine, gingivite, CP sévère)<sup>524,525,601</sup>.

Dans les travaux futurs, cette étude sera reprise et améliorée avec la technique du « PrimeFlow™ RNA Assay » pour la détection des transcrits CD138 et EBER.

Cette technique devrait nous permettre de mieux caractériser l'évolution phénotypique des LB dans la lésion parodontale et également d'en étudier les profils de sécrétion cytokinique.

En écho avec les développements précédents concernant la pathogénicité des PC dans le LPO, il est attendu que les productions de cytokines par ces cellules jouent un rôle clé pour expliquer la pathogénèse.

En effet, les LB produisent non seulement une variété de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, TGF- $\beta$  ...) mais aussi des facteurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , les MMP, l'IL-6 ...) qui contribuent à la dégradation du parodonte<sup>648</sup>.

Dans ce contexte, les transcrits d'IL-10 ou d'IL-6 (pour faire écho avec le LPO) pourraient être détectés en combinaison avec les transcrits CD138 et EBER.

Concernant l'impact du traitement de la CP sur la présence virale, la littérature présente des résultats hétérogènes.

Une étude constate que malgré une diminution notable de la charge virale d'EBV à 7 jours après le traitement conventionnel, le virus serait retrouvé dans les poches profondes à 1 mois post-traitement.

La thérapeutique initiale n'aurait donc à elle seule qu'un effet temporaire sur la réduction de la charge virale dans les sites les plus atteints<sup>649</sup>.

D'autres études rapportent que la thérapeutique initiale résulte en l'élimination de l'EBV dans la poche parodontale et le LCG à 6 mois post-traitement<sup>583,585</sup>.

Nos résultats (cf. Résultats, Partie 2, III.) concernant la charge EBV dans la poche parodontale sont difficilement interprétables mais ceux concernant la charge salivaire EBV semblent être en accord avec la majorité de la littérature, même si notre temps de réévaluation est plus court. De ce fait, ils méritent d'être vérifiés sur une plus grande cohorte.

### **Partie 3 : Conclusion et proposition d'un modèle de travail : « the EBV model »**

L'ensemble de ce mémoire et des résultats présentés orientent la suite de nos travaux autour de 3 questions de fond qui ont été pour la plupart largement discutées :

- Pourquoi observe-t-on une forte accumulation de PC infectés par EBV dans les parodontites ou les lichens ?
- De quelle manière, la présence des PC modifie le microenvironnement inflammatoire ?
- L'infection des épithéliums est-elle la conséquence de la production massive de particules virales produites localement par les PC infectés ?

L'infection des épithéliums parodontaux par EBV est peut-être l'aspect le plus nouveau de nos travaux et je souhaite terminer ce mémoire en discutant cet aspect.

L'infection des CE par EBV est bien décrite par la littérature<sup>34,52</sup> mais la présence d'EBV dans les EJ et ES du parodonte constitue un nouveau paradigme tant pour sa biologie que concernant les mécanismes responsables de la perte de l'attache épithéliale au cours de la parodontite.

Les CE n'expriment pas CD21, le récepteur lymphocytaire pour EBV, mais l'infection de ce type cellulaire est rendue possible par la présence d'intégrines de surface et de la protéine Ephrin A2<sup>68,69</sup>.

De plus, l'infection EBV des CE est certainement facilitée par une production locale et d'EBV et un contact étroit entre les cellules épithéliales et les PC producteurs de virus.

Au regard de nos résultats, ces conditions ont toutes les chances d'être remplies au cours de la parodontite avec d'une part une abondance de PC infectés infiltrés et d'autre part la présence immédiate d'un EJ non-kératinisé et sensible à l'infection EBV<sup>13</sup>.

Notre hypothèse de travail est donc que l'infiltration massive de PC infectés par EBV dans la région inflammatoire du parodonte favorise grandement l'infection des CE et participe ainsi à la pathogénèse.

Dans ce contexte, les résultats obtenus au cours de ma thèse nous permettent de proposer un modèle (*Figure 26*) articulé autour de la contribution d'EBV et des PC dans la pathogénèse du LPO et de la CP.

Ce modèle que nous appelons « EBV model » fait l'objet de l'écriture d'une revue actuellement en cours pour une publication internationale.

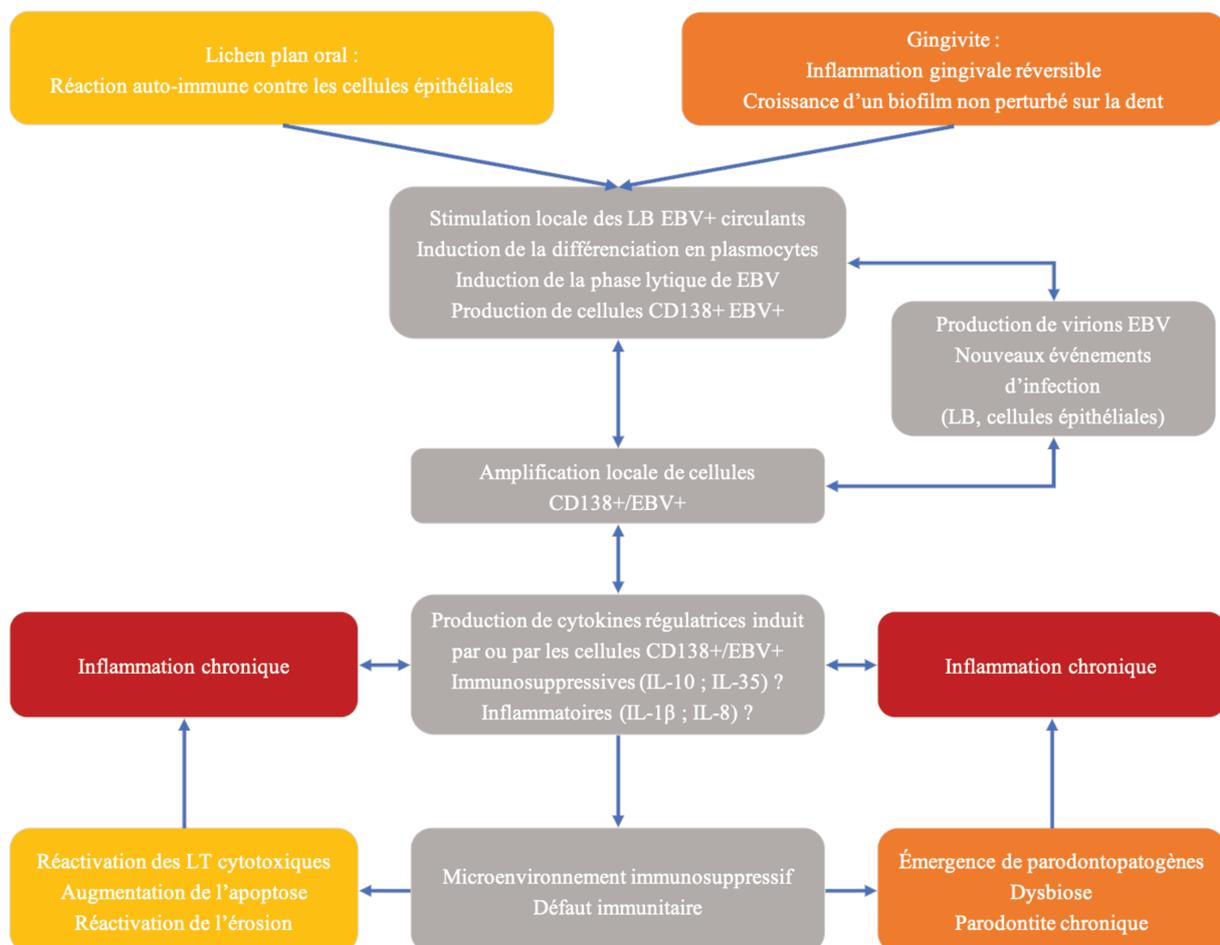


Figure 26 : Modèle EBV.

Implications de EBV et des PC dans les pathologies inflammatoires chroniques de la cavité orale.

En perspective, pour approfondir, confirmer ou infirmer, la participation de l'EBV à l'étiologie du LPO et de la CP, l'association d'un traitement antiviral avec les traitements conventionnels de ces maladies apparaît comme une proposition originale et très innovante.

La mise en place d'un large essai clinique prospectif randomisé en double aveugle (anti-viral contre placebo) avec suivi clinique et viro-biologique représente certainement un des moyens les plus directs de démontrer la très probable implication de EBV dans ces maladies.

À ce jour, les molécules anti-EBV restent rares, seuls les dérivés de l'acyclovir (ganciclovir, valaciclovir ...) sont connus pour exercer une activité thérapeutique anti herpétique avérée notamment pour traiter les réactivations HSV et CMV.

Pour EBV, si ces molécules agissent *in vitro* et bloquent les stades tardifs de la réplication EBV, leurs effets sont bien moins documentés *in vivo* au niveau thérapeutique.

L'acyclovir agit comme un inhibiteur de la polymérase virale et bloque la synthèse des génomes viraux mais n'exerce pas d'activité sur les stades de latence auxquels sont associés les mécanismes de la carcinogénèse.

À notre connaissance, seulement deux études partielles documentent les effets d'un traitement par acyclovir sur la CP.

La première étude rapporte le cas d'un patient atteint de parodontite réfractaire associée à une importante charge virale EBV sous-gingivale.

Un traitement au valaciclovir (500mg, 2 fois par jour, pendant 10 jours) a provoqué des niveaux indétectables d'infection virale à un an et entraîné une rémission de la maladie<sup>650</sup>.

La seconde étude concerne 59 patients atteints d'une CP dont 30 reçoivent le valaciclovir pendant une semaine (groupe test) et les 29 autres reçoivent un placebo (groupe témoin) et tous bénéficient d'une thérapeutique parodontale non chirurgicale par détartrage et surfaçage. Cette étude met en évidence qu'à 2 et 6 mois après le traitement, les patients du groupe test présentaient une réduction moyenne de la PPS plus élevée que ceux du groupe témoin ( $p < 0,05$ )<sup>651</sup>.

Ces études encore préliminaires encouragent à réaliser des essais cliniques de plus grande ampleur et laissent espérer qu'un traitement anti-herpétique, ciblant EBV, pourrait constituer une avancée majeure dans la prise en charge thérapeutique de la CP et peut-être du LPO.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Otomo-Corgel, J., Pucher, J. J., Rethman, M. P. & Reynolds, M. A. State of the science: chronic periodontitis and systemic health. *J. Evid.-Based Dent. Pract.* **12**, 20–28 (2012).
2. Cullinan, M. P. & Seymour, G. J. Periodontal disease and systemic illness: will the evidence ever be enough? *Periodontol. 2000* **62**, 271–286 (2013).
3. Ameet M, M., Avneesh H, T., Babita R, P. & Pramod P, M. The relationship between periodontitis and systemic diseases - hype or hope? *J. Clin. Diagn. Res. JCDR* **7**, 758–762 (2013).
4. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 30–44 (2015).
5. Mark Welch, J. L., Rossetti, B. J., Rieken, C. W., Dewhirst, F. E. & Borisy, G. G. Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, E791-800 (2016).
6. Olsen, I. & van Winkelhoff, A. J. Acute focal infections of dental origin. *Periodontol. 2000* **65**, 178–189 (2014).
7. Vieira Colombo, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A. R. R., Martins do Souto, R. & Maciel da Silva-Boghossian, C. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb. Pathog.* **94**, 27–34 (2016).
8. Xu, H., Sobue, T., Bertolini, M., Thompson, A. & Dongari-Bagtzoglou, A. Streptococcus oralis and Candida albicans Synergistically Activate  $\mu$ -Calpain to Degrade E-cadherin From Oral Epithelial Junctions. *J. Infect. Dis.* **214**, 925–934 (2016).
9. Pinto, G., Silva, M. D., Peddey, M., Sillankorva, S. & Azeredo, J. The role of bacteriophages in periodontal health and disease. *Future Microbiol.* **11**, 1359–1369 (2016).
10. Madinier, I., Doglio, A., Cagnon, L., Lefèbvre, J. C. & Monteil, R. A. Epstein-Barr virus DNA detection in gingival tissues of patients undergoing surgical extractions. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **30**, 237–243 (1992).
11. Madinier, I., Doglio, A., Cagnon, L., Lefèbvre, J. C. & Monteil, R. A. Southern blot detection of human papillomaviruses (HPVs) DNA sequences in gingival tissues. *J. Periodontol.* **63**, 667–673 (1992).
12. Slots, J. Herpesviral-bacterial synergy in the pathogenesis of human periodontitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **20**, 278–283 (2007).
13. Vincent-Bugnas, S. *et al.* EBV infection is common in gingival epithelial cells of the periodontium and worsens during chronic periodontitis. *PloS One* **8**, e80336 (2013).
14. Burkitt, D. & O'conor, G. T. Malignant lymphoma in African children. I. A clinical syndrome. *Cancer* **14**, 258–269 (1961).
15. Burkitt, D. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* **194**, 232–234 (1962).
16. Burkitt, D. Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br. Med. J.* **2**, 1019–1023 (1962).
17. Burkitt, D. & Wright, D. Geographical and tribal distribution of the African lymphoma in Uganda. *Br. Med. J.* **1**, 569–573 (1966).
18. Epstein, M. A., Achong, B. G. & Barr, Y. M. VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 702–703 (1964).
19. Henle, G., Henle, W. & Diehl, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-yppe virus to infectious mononucleosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**, 94–101 (1968).
20. Henle, W., Henle, G., Lanier, A. P. & Bornkamm, G. W. Attachment of antinuclear antibodies to nasopharyngeal carcinoma or other cells during preparation of biopsy imprints. *J. Natl. Cancer Inst.* **76**, 1041–1046 (1986).
21. Perri, F. *et al.* Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma: the other side of the coin. *Anticancer. Drugs* **26**, 1017–1025 (2015).
22. Tsao, S. W., Tsang, C. M. & Lo, K. W. Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372**, (2017).
23. Adachi, Y. *et al.* Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *J. Clin. Gastroenterol.* **23**, 207–210 (1996).
24. Sousa, H., Pinto-Correia, A.-L., Medeiros, R. & Dinis-Ribeiro, M. Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma: the question is what is the significance? *World J. Gastroenterol.* **14**, 4347–4351 (2008).

25. Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M. & Yoshiyama, H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* **4**, 3420–3439 (2012).
26. Shinozaki-Ushiku, A., Kunita, A. & Fukayama, M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int. J. Oncol.* **46**, 1421–1434 (2015).
27. Shannon-Lowe, C., Rickinson, A. B. & Bell, A. I. Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **372**, (2017).
28. Vockerodt, M., Cader, F. Z., Shannon-Lowe, C. & Murray, P. Epstein-Barr virus and the origin of Hodgkin lymphoma. *Chin. J. Cancer* **33**, 591–597 (2014).
29. Rowe, M., Fitzsimmons, L. & Bell, A. I. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Chin. J. Cancer* **33**, 609–619 (2014).
30. Battle-Lopez, A. *et al.* Epstein-Barr virus-associated diffuse large B-cell lymphoma: diagnosis, difficulties and therapeutic options. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **16**, 411–421 (2016).
31. Gru, A. A. *et al.* The Epstein-Barr Virus (EBV) in T Cell and NK Cell Lymphomas: Time for a Reassessment. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* **10**, 456–467 (2015).
32. Ziegler, J. L. *et al.* Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 631–633 (1982).
33. Linke-Serinsöz, E., Fend, F. & Quintanilla-Martinez, L. Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein-Barr virus (EBV) related lymphomas, pathology view point. *Semin. Diagn. Pathol.* **34**, 352–363 (2017).
34. Young, L. S. & Rickinson, A. B. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 757–768 (2004).
35. Dambaugh, T., Hennessy, K., Chamnankit, L. & Kieff, E. U2 region of Epstein-Barr virus DNA may encode Epstein-Barr nuclear antigen 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 7632–7636 (1984).
36. Addlinger, H. K., Delius, H., Freese, U. K., Clarke, J. & Bornkamm, G. W. A putative transforming gene of Jijoye virus differs from that of Epstein-Barr virus prototypes. *Virology* **141**, 221–234 (1985).
37. Sample, J. *et al.* Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* **64**, 4084–4092 (1990).
38. Buisson, M. *et al.* Development of an Epstein-Barr virus type 2 (EBV-2)-associated hepatic B cell non-Hodgkin's lymphoma in an HIV-1-infected patient following a change in the EBV dominant type. *Leukemia* **13**, 298–301 (1999).
39. Weiss, E. R. *et al.* Early Epstein-Barr Virus Genomic Diversity and Convergence toward the B95.8 Genome in Primary Infection. *J. Virol.* **92**, (2018).
40. Mechelli, R. *et al.* Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology* **84**, 1362–1368 (2015).
41. Hutt-Fletcher, L. M. EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virol.* **10**, 1155–1162 (2015).
42. Lindahl, T. *et al.* Covalently closed circular duplex DNA of Epstein-Barr virus in a human lymphoid cell line. *J. Mol. Biol.* **102**, 511–530 (1976).
43. Farrell, P. J. Epstein-Barr virus. The B95-8 strain map. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **174**, 3–12 (2001).
44. Draborg, A. H., Duus, K. & Houen, G. Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 370516 (2012).
45. Fingeroth, J. D. *et al.* Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4510–4514 (1984).
46. Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E. & Cooper, N. R. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J. Virol.* **55**, 347–351 (1985).
47. Young, K. A., Chen, X. S., Holers, V. M. & Hannan, J. P. Isolating the Epstein-Barr virus gp350/220 binding site on complement receptor type 2 (CR2/CD21). *J. Biol. Chem.* **282**, 36614–36625 (2007).
48. Li, Q. *et al.* Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J. Virol.* **71**, 4657–4662 (1997).
49. Spear, P. G. & Longnecker, R. Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.* **77**, 10179–10185 (2003).
50. Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S. & Longnecker, R. Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**, 369–381 (2011).

51. Miller, G., El-Guindy, A., Countryman, J., Ye, J. & Gradoville, L. Lytic cycle switches of oncogenic human gammaherpesviruses. *Adv. Cancer Res.* **97**, 81–109 (2007).
52. Temple, R. M. *et al.* Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16544–16549 (2014).
53. Tsang, C. M. *et al.* Epstein-Barr virus infection and persistence in nasopharyngeal epithelial cells. *Chin. J. Cancer* **33**, 549–555 (2014).
54. Takada, K. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol. Pathol. MP* **53**, 255–261 (2000).
55. Khammissa, R. A. G., Fourie, J., Chandran, R., Lemmer, J. & Feller, L. Epstein-Barr Virus and Its Association with Oral Hairy Leukoplakia: A Short Review. *Int. J. Dent.* **2016**, 4941783 (2016).
56. Kikuchi, K. *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-associated epithelial and non-epithelial lesions of the oral cavity. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* **53**, 95–109 (2017).
57. Jiang, R., Gu, X., Nathan, C.-A. & Hutt-Fletcher, L. Laser-capture microdissection of oropharyngeal epithelium indicates restriction of Epstein-Barr virus receptor/CD21 mRNA to tonsil epithelial cells. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **37**, 626–633 (2008).
58. Janz, A. *et al.* Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J. Virol.* **74**, 10142–10152 (2000).
59. Wang, X. & Hutt-Fletcher, L. M. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp42 can bind to B cells but is not able to infect. *J. Virol.* **72**, 158–163 (1998).
60. Borza, C. M. & Hutt-Fletcher, L. M. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein-Barr virus. *Nat. Med.* **8**, 594–599 (2002).
61. Kirschner, A. N., Lowrey, A. S., Longnecker, R. & Jardetzky, T. S. Binding-site interactions between Epstein-Barr virus fusion proteins gp42 and gH/gL reveal a peptide that inhibits both epithelial and B-cell membrane fusion. *J. Virol.* **81**, 9216–9229 (2007).
62. Feederle, R. *et al.* Epstein-Barr virus B95.8 produced in 293 cells shows marked tropism for differentiated primary epithelial cells and reveals interindividual variation in susceptibility to viral infection. *Int. J. Cancer* **121**, 588–594 (2007).
63. Imai, S., Nishikawa, J. & Takada, K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J. Virol.* **72**, 4371–4378 (1998).
64. Shannon-Lowe, C. D., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, A. B. & Delecluse, H.-J. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7065–7070 (2006).
65. Shannon-Lowe, C. & Rowe, M. Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog.* **7**, e1001338 (2011).
66. Zachary, I. C. How neuropilin-1 regulates receptor tyrosine kinase signalling: the knowns and known unknowns. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 1583–1591 (2011).
67. Wang, H.-B. *et al.* Neuropilin 1 is an entry factor that promotes EBV infection of nasopharyngeal epithelial cells. *Nat. Commun.* **6**, 6240 (2015).
68. Zhang, H. *et al.* Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat. Microbiol.* **3**, 1–8 (2018).
69. Chen, J. *et al.* Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat. Microbiol.* **3**, 172–180 (2018).
70. Thomas, R. *et al.* Evidence of shared Epstein-Barr viral isolates between sexual partners, and low level EBV in genital secretions. *J. Med. Virol.* **78**, 1204–1209 (2006).
71. Hutt-Fletcher, L. M. The Long and Complicated Relationship between Epstein-Barr Virus and Epithelial Cells. *J. Virol.* **91**, (2017).
72. Karajannis, M. A., Hummel, M., Anagnostopoulos, I. & Stein, H. Strict lymphotropism of Epstein-Barr virus during acute infectious mononucleosis in nonimmunocompromised individuals. *Blood* **89**, 2856–2862 (1997).
73. Perry, M. E., Jones, M. M. & Mustafa, Y. Structure of the crypt epithelium in human palatine tonsils. *Acta Oto-Laryngol. Suppl.* **454**, 53–59 (1988).
74. Hudnall, S. D. *et al.* Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc* **18**, 519–527 (2005).

75. Sixbey, J. W., Nedrud, J. G., Raab-Traub, N., Hanes, R. A. & Pagano, J. S. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* **310**, 1225–1230 (1984).
76. Pegtel, D. M., Middeldorp, J. & Thorley-Lawson, D. A. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J. Virol.* **78**, 12613–12624 (2004).
77. Walling, D. M., Flaitz, C. M., Nichols, C. M., Hudnall, S. D. & Adler-Storthz, K. Persistent productive Epstein-Barr virus replication in normal epithelial cells in vivo. *J. Infect. Dis.* **184**, 1499–1507 (2001).
78. Frangou, P., Buettner, M. & Niedobitek, G. Epstein-Barr virus (EBV) infection in epithelial cells in vivo: rare detection of EBV replication in tongue mucosa but not in salivary glands. *J. Infect. Dis.* **191**, 238–242 (2005).
79. Dunmire, S. K., Grimm, J. M., Schmeling, D. O., Balfour, H. H. & Hogquist, K. A. The Incubation Period of Primary Epstein-Barr Virus Infection: Viral Dynamics and Immunologic Events. *PLoS Pathog.* **11**, e1005286 (2015).
80. Balandraud, N. & Roudier, J. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine Rev. Rhum.* **85**, 165–170 (2018).
81. Thorley-Lawson, D. A., Hawkins, J. B., Tracy, S. I. & Shapiro, M. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection. *Curr. Opin. Virol.* **3**, 227–232 (2013).
82. Chaganti, S. *et al.* Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* **106**, 4249–4252 (2005).
83. Hochberg, D. *et al.* Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 239–244 (2004).
84. Chaganti, S. *et al.* Epstein-Barr virus colonization of tonsillar and peripheral blood B-cell subsets in primary infection and persistence. *Blood* **113**, 6372–6381 (2009).
85. Chaganti, S. *et al.* Epstein-Barr virus persistence in the absence of conventional memory B cells: IgM+IgD+CD27+ B cells harbor the virus in X-linked lymphoproliferative disease patients. *Blood* **112**, 672–679 (2008).
86. Thorley-Lawson, D. A. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **390**, 151–209 (2015).
87. Laichalk, L. L. & Thorley-Lawson, D. A. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* **79**, 1296–1307 (2005).
88. Murata, T. & Tsurumi, T. Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Rev. Med. Virol.* **24**, 142–153 (2014).
89. Fixman, E. D., Hayward, G. S. & Hayward, S. D. Replication of Epstein-Barr virus oriLyt: lack of a dedicated virally encoded origin-binding protein and dependence on Zta in cotransfection assays. *J. Virol.* **69**, 2998–3006 (1995).
90. Gruffat, H. & Sergeant, A. Characterization of the DNA-binding site repertoire for the Epstein-Barr virus transcription factor R. *Nucleic Acids Res.* **22**, 1172–1178 (1994).
91. Ragoczy, T., Heston, L. & Miller, G. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J. Virol.* **72**, 7978–7984 (1998).
92. Gruffat, H. *et al.* Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J. Virol.* **76**, 9635–9644 (2002).
93. Salek-Ardakani, S., Arrand, J. R. & Mackett, M. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology* **304**, 342–351 (2002).
94. Mettenleiter, T. C. Herpesvirus Assembly and Egress. *J. Virol.* **76**, 1537–1547 (2002).
95. Davies, M. L. *et al.* Cellular factors associated with latency and spontaneous Epstein-Barr virus reactivation in B-lymphoblastoid cell lines. *Virology* **400**, 53–67 (2010).
96. Robinson, A. R., Kwek, S. S. & Kenney, S. C. The B-cell specific transcription factor, Oct-2, promotes Epstein-Barr virus latency by inhibiting the viral immediate-early protein, BZLF1. *PLoS Pathog.* **8**, e1002516 (2012).
97. Raver, R. M., Panfil, A. R., Hagemeyer, S. R. & Kenney, S. C. The B-cell-specific transcription factor and master regulator Pax5 promotes Epstein-Barr virus latency by negatively regulating the viral immediate early protein BZLF1. *J. Virol.* **87**, 8053–8063 (2013).

98. Ma, S.-D. *et al.* An Epstein-Barr Virus (EBV) mutant with enhanced BZLF1 expression causes lymphomas with abortive lytic EBV infection in a humanized mouse model. *J. Virol.* **86**, 7976–7987 (2012).
99. Kenney, S. C. & Mertz, J. E. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* **26**, 60–68 (2014).
100. Sun, C. C. & Thorley-Lawson, D. A. Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J. Virol.* **81**, 13566–13577 (2007).
101. Vrzalikova, K. *et al.* Down-regulation of BLIMP1 $\alpha$  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**, 5907–5917 (2011).
102. Buettner, M. *et al.* Lytic Epstein-Barr virus infection in epithelial cells but not in B-lymphocytes is dependent on Blimp1. *J. Gen. Virol.* **93**, 1059–1064 (2012).
103. Heslop, H. E. How I treat EBV lymphoproliferation. *Blood* **114**, 4002–4008 (2009).
104. Kanemitsu, N. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus-encoded proteins in extranodal NK/T-cell Lymphoma, nasal type (ENKL): differences in biologic and clinical behaviors of LMP1-positive and -negative ENKL. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 2164–2172 (2012).
105. Chiang, A. K., Tao, Q., Srivastava, G. & Ho, F. C. Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer* **68**, 285–290 (1996).
106. Miyashita, E. M., Yang, B., Lam, K. M., Crawford, D. H. & Thorley-Lawson, D. A. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **80**, 593–601 (1995).
107. Young, L. *et al.* Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* **321**, 1080–1085 (1989).
108. Kurth, J. *et al.* EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* **13**, 485–495 (2000).
109. Leight, E. R. & Sugden, B. EBNA-1: a protein pivotal to latent infection by Epstein-Barr virus. *Rev. Med. Virol.* **10**, 83–100 (2000).
110. Kennedy, G., Komano, J. & Sugden, B. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 14269–14274 (2003).
111. Gruhne, B. *et al.* The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 2313–2318 (2009).
112. Levitskaya, J. *et al.* Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**, 685–688 (1995).
113. Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. & Masucci, M. G. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12616–12621 (1997).
114. Wang, F. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 3452–3456 (1987).
115. Abbot, S. D. *et al.* Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces expression of the virus-encoded latent membrane protein. *J. Virol.* **64**, 2126–2134 (1990).
116. Alfieri, C., Birkenbach, M. & Kieff, E. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* **181**, 595–608 (1991).
117. Harada, S. & Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* **71**, 6611–6618 (1997).
118. Murray, R. J. *et al.* Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J. Exp. Med.* **176**, 157–168 (1992).
119. Tomkinson, B., Robertson, E. & Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* **67**, 2014–2025 (1993).
120. White, R. E. *et al.* Extensive co-operation between the Epstein-Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PLoS One* **5**, e13979 (2010).
121. White, R. E. *et al.* EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Invest.* **122**, 1487–1502 (2012).

122. Kaye, K. M., Izumi, K. M. & Kieff, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 9150–9154 (1993).
123. Wang, D., Liebowitz, D. & Kieff, E. An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* **43**, 831–840 (1985).
124. Dawson, C. W., Rickinson, A. B. & Young, L. S. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature* **344**, 777–780 (1990).
125. Wang, F. *et al.* 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**, 2309–2318 (1990).
126. Uchida, J. *et al.* Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* **286**, 300–303 (1999).
127. Cahir-McFarland, E. D., Davidson, D. M., Schauer, S. L., Duong, J. & Kieff, E. NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6055–6060 (2000).
128. Eliopoulos, A. G., Gallagher, N. J., Blake, S. M., Dawson, C. W. & Young, L. S. 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**, 16085–16096 (1999).
129. Seavey, M. M. & Dobrzanski, P. The many faces of Janus kinase. *Biochem. Pharmacol.* **83**, 1136–1145 (2012).
130. Higuchi, M., Kieff, E. & Izumi, K. M. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 putative Janus kinase 3 (JAK3) binding domain does not mediate JAK3 association or activation in B-lymphoma or lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* **76**, 455–459 (2002).
131. Longnecker, R. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv. Cancer Res.* **79**, 175–200 (2000).
132. Rovedo, M. & Longnecker, R. Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J. Virol.* **81**, 84–94 (2007).
133. Rechsteiner, M. P. *et al.* Latent Membrane Protein 2B Regulates Susceptibility to Induction of Lytic Epstein-Barr Virus Infection. *J. Virol.* **82**, 1739–1747 (2008).
134. Wasil, L. R., Tomaszewski, M. J., Hoji, A. & Rowe, D. T. The effect of Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 2 expression on the kinetics of early B cell infection. *PLoS One* **8**, e54010 (2013).
135. Pegtel, D. M. *et al.* Epstein-Barr-virus-encoded LMP2A induces primary epithelial cell migration and invasion: possible role in nasopharyngeal carcinoma metastasis. *J. Virol.* **79**, 15430–15442 (2005).
136. Shah, K. M. *et al.* The EBV-encoded latent membrane proteins, LMP2A and LMP2B, limit the actions of interferon by targeting interferon receptors for degradation. *Oncogene* **28**, 3903–3914 (2009).
137. Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K. & Takada, K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J.* **21**, 954–965 (2002).
138. Kitagawa, N. *et al.* Epstein-Barr virus-encoded poly(A)-RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* **19**, 6742–6750 (2000).
139. Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K. & Takada, K. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer Res.* **64**, 5332–5337 (2004).
140. Lerner, M. R., Andrews, N. C., Miller, G. & Steitz, J. A. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 805–809 (1981).
141. Kapsogeorgou, E. K., Abu-Helu, R. F., Moutsopoulos, H. M. & Manoussakis, M. N. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum.* **52**, 1517–1521 (2005).
142. Hoshino, Y. *et al.* Antigen-driven expansion and contraction of CD8<sup>+</sup>-activated T cells in primary EBV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **163**, 5735–5740 (1999).
143. McAulay, K. A. *et al.* HLA class I polymorphisms are associated with development of infectious mononucleosis upon primary EBV infection. *J. Clin. Invest.* **117**, 3042–3048 (2007).
144. Taylor, G. S., Long, H. M., Brooks, J. M., Rickinson, A. B. & Hislop, A. D. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 787–821 (2015).

145. Hjalgrim, H. *et al.* HLA-A alleles and infectious mononucleosis suggest a critical role for cytotoxic T-cell response in EBV-related Hodgkin lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6400–6405 (2010).
146. Hwang, A. E. *et al.* Evidence of genetic susceptibility to infectious mononucleosis: a twin study. *Epidemiol. Infect.* **140**, 2089–2095 (2012).
147. Rostgaard, K., Wohlfahrt, J. & Hjalgrim, H. A genetic basis for infectious mononucleosis: evidence from a family study of hospitalized cases in Denmark. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **58**, 1684–1689 (2014).
148. de Martel, C. *et al.* Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol.* **13**, 607–615 (2012).
149. Khan, G. & Hashim, M. J. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990–2010. *Infect. Agent. Cancer* **9**, 38 (2014).
150. Young, L. S., Yap, L. F. & Murray, P. G. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat. Rev. Cancer* **16**, 789–802 (2016).
151. Pattle, S. B. & Farrell, P. J. The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* **6**, 1193–1205 (2006).
152. Young, L. S. & Dawson, C. W. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Chin. J. Cancer* **33**, 581–590 (2014).
153. Greenspan, J. S. *et al.* Replication of Epstein-Barr virus within the epithelial cells of oral ‘hairy’ leukoplakia, an AIDS-associated lesion. *N. Engl. J. Med.* **313**, 1564–1571 (1985).
154. Greenspan, J. S. & Greenspan, D. Oral hairy leukoplakia: diagnosis and management. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **67**, 396–403 (1989).
155. Greenspan, J. S. *et al.* Comparison of cytopathic changes in oral hairy leukoplakia with in situ hybridization for EBV DNA. *Oral Dis.* **4**, 95–99 (1998).
156. Greenspan, J. S., Greenspan, D. & Webster-Cyriaque, J. Hairy leukoplakia; lessons learned: 30-plus years. *Oral Dis.* **22 Suppl 1**, 120–127 (2016).
157. Walling, D. M., Etienne, W., Ray, A. J., Flaitz, C. M. & Nichols, C. M. Persistence and transition of Epstein-Barr virus genotypes in the pathogenesis of oral hairy leukoplakia. *J. Infect. Dis.* **190**, 387–395 (2004).
158. Walling, D. M., Flaitz, C. M. & Nichols, C. M. Epstein-Barr virus replication in oral hairy leukoplakia: response, persistence, and resistance to treatment with valacyclovir. *J. Infect. Dis.* **188**, 883–890 (2003).
159. Balandraud, N. *et al.* Epstein-Barr virus load in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis: accurate quantification using real-time polymerase chain reaction. *Arthritis Rheum.* **48**, 1223–1228 (2003).
160. Poole, B. D., Gross, T., Maier, S., Harley, J. B. & James, J. A. Lupus-like autoantibody development in rabbits and mice after immunization with EBNA-1 fragments. *J. Autoimmun.* **31**, 362–371 (2008).
161. Larsen, M. *et al.* Exhausted cytotoxic control of Epstein-Barr virus in human lupus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002328 (2011).
162. Pender, M. P., Csurhes, P. A., Pfluger, C. M. M. & Burrows, S. R. CD8 T cell deficiency impairs control of Epstein-Barr virus and worsens with age in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **83**, 353–354 (2012).
163. Toussiro, E. & Roudier, J. Epstein-Barr virus in autoimmune diseases. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* **22**, 883–896 (2008).
164. Poole, B. D., Scofield, R. H., Harley, J. B. & James, J. A. Epstein-Barr virus and molecular mimicry in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **39**, 63–70 (2006).
165. Pender, M. P. Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases. *Trends Immunol.* **24**, 584–588 (2003).
166. Manzo, A., Bombardieri, M., Humby, F. & Pitzalis, C. Secondary and ectopic lymphoid tissue responses in rheumatoid arthritis: from inflammation to autoimmunity and tissue damage/remodeling. *Immunol. Rev.* **233**, 267–285 (2010).
167. Burnard, S., Lechner-Scott, J. & Scott, R. J. EBV and MS: Major cause, minor contribution or red-herring? *Mult. Scler. Relat. Disord.* **16**, 24–30 (2017).
168. Draborg, A., Izarzugaza, J. M. G. & Houen, G. How compelling are the data for Epstein-Barr virus being a trigger for systemic lupus and other autoimmune diseases? *Curr. Opin. Rheumatol.* **28**, 398–404 (2016).
169. Sakkas, L. I., Daoussis, D., Liossis, S.-N. & Bogdanos, D. P. The Infectious Basis of ACPA-Positive Rheumatoid Arthritis. *Front. Microbiol.* **8**, 1853 (2017).

170. Croia, C. *et al.* Implication of Epstein-Barr virus infection in disease-specific autoreactive B cell activation in ectopic lymphoid structures of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **66**, 2545–2557 (2014).
171. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **372**, 1502–1517 (2008).
172. Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol.* **61**, 288–299 (2007).
173. Stys, P. K., Zamponi, G. W., van Minnen, J. & Geurts, J. J. G. Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nat. Rev. Neurosci.* **13**, 507–514 (2012).
174. Popescu, B. F. G. & Lucchinetti, C. F. Pathology of demyelinating diseases. *Annu. Rev. Pathol.* **7**, 185–217 (2012).
175. Chard, D. T. *et al.* Brain atrophy in clinically early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **125**, 327–337 (2002).
176. Frischer, J. M. *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain J. Neurol.* **132**, 1175–1189 (2009).
177. Fischer, M. T. *et al.* NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain J. Neurol.* **135**, 886–899 (2012).
178. Howell, O. W. *et al.* Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **134**, 2755–2771 (2011).
179. Ascherio, A. & Munger, K. L. Epstein-barr virus infection and multiple sclerosis: a review. *J. Neuroimmune Pharmacol. Off. J. Soc. NeuroImmune Pharmacol.* **5**, 271–277 (2010).
180. Handel, A. E. *et al.* An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis. *PloS One* **5**, (2010).
181. Ascherio, A. & Munger, K. L. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann. Neurol.* **61**, 288–299 (2007).
182. Levin, L. I., Munger, K. L., O'Reilly, E. J., Falk, K. I. & Ascherio, A. Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **67**, 824–830 (2010).
183. Almohmeed, Y. H., Avenell, A., Aucott, L. & Vickers, M. A. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PloS One* **8**, e61110 (2013).
184. Kvistad, S. *et al.* Antibodies to Epstein-Barr virus and MRI disease activity in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **20**, 1833–1840 (2014).
185. Pender, M. P. The Essential Role of Epstein-Barr Virus in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *The Neuroscientist* **17**, 351–367 (2011).
186. Lünemann, J. D. & Münz, C. EBV in MS: guilty by association? *Trends Immunol.* **30**, 243–248 (2009).
187. Hauser, S. L. *et al.* B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 676–688 (2008).
188. Serafini, B. *et al.* Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* **204**, 2899–2912 (2007).
189. Serafini, B. *et al.* Epstein-Barr virus latent infection and BAFF expression in B cells in the multiple sclerosis brain: implications for viral persistence and intrathecal B-cell activation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **69**, 677–693 (2010).
190. Serafini, B., Muzio, L., Rosicarelli, B. & Aloisi, F. Radioactive in situ hybridization for Epstein-Barr virus-encoded small RNA supports presence of Epstein-Barr virus in the multiple sclerosis brain. *Brain J. Neurol.* **136**, e233 (2013).
191. Angelini, D. F. *et al.* Increased CD8<sup>+</sup> T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog.* **9**, e1003220 (2013).
192. Fernández-Menéndez, S., Fernández-Morán, M., Fernández-Vega, I., Pérez-Álvarez, A. & Villafani-Echazú, J. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. From evidence to therapeutic strategies. *J. Neurol. Sci.* **361**, 213–219 (2016).
193. Wucherpfennig, K. W. & Strominger, J. L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* **80**, 695–705 (1995).
194. Lünemann, J. D. *et al.* EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN-gamma and IL-2. *J. Exp. Med.* **205**, 1763–1773 (2008).

195. Hogeboom, C. Peptide motif analysis predicts lymphocytic choriomeningitis virus as trigger for multiple sclerosis. *Mol. Immunol.* **67**, 625–635 (2015).
196. van Noort, J. M., Bajramovic, J. J., Plomp, A. C. & van Stipdonk, M. J. Mistaken self, a novel model that links microbial infections with myelin-directed autoimmunity in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **105**, 46–57 (2000).
197. Márquez, A. C. & Horwitz, M. S. The Role of Latently Infected B Cells in CNS Autoimmunity. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
198. Pender, M. P., Csurhes, P. A., Lenarczyk, A., Pfluger, C. M. M. & Burrows, S. R. Decreased T cell reactivity to Epstein-Barr virus infected lymphoblastoid cell lines in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **80**, 498–505 (2009).
199. Pender, M. P. *et al.* Epstein-Barr virus-specific adoptive immunotherapy for progressive multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **20**, 1541–1544 (2014).
200. Menge, T., Dubey, D., Warnke, C., Hartung, H.-P. & Stüve, O. Ocrelizumab for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Expert Rev. Neurother.* **16**, 1131–1139 (2016).
201. Milo, R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* **15**, 714–718 (2016).
202. Rizzo, F. *et al.* Interferon- $\beta$  therapy specifically reduces pathogenic memory B cells in multiple sclerosis patients by inducing a FAS-mediated apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* **94**, 886–894 (2016).
203. Morandi, E., Jagessar, S. A., 't Hart, B. A. & Gran, B. EBV Infection Empowers Human B Cells for Autoimmunity: Role of Autophagy and Relevance to Multiple Sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **199**, 435–448 (2017).
204. Pons-Estel, G. J., Alarcón, G. S., Scofield, L., Reinlib, L. & Cooper, G. S. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* **39**, 257–268 (2010).
205. Hochberg, M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **40**, 1725 (1997).
206. Smith, P. P. & Gordon, C. Systemic lupus erythematosus: clinical presentations. *Autoimmun. Rev.* **10**, 43–45 (2010).
207. Rahman, A. & Isenberg, D. A. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **358**, 929–939 (2008).
208. Dall'era, M. & Chakravarty, E. F. Treatment of mild, moderate, and severe lupus erythematosus: focus on new therapies. *Curr. Rheumatol. Rep.* **13**, 308–316 (2011).
209. Tsokos, G. C. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2110–2121 (2011).
210. Deapen, D. *et al.* A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **35**, 311–318 (1992).
211. Namjou, B., Kilpatrick, J. & Harley, J. B. Genetics of clinical expression in SLE. *Autoimmunity* **40**, 602–612 (2007).
212. Sestak, A. L., Fürtrohr, B. G., Harley, J. B., Merrill, J. T. & Namjou, B. The genetics of systemic lupus erythematosus and implications for targeted therapy. *Ann. Rheum. Dis.* **70 Suppl 1**, i37-43 (2011).
213. Ramos, P. S. *et al.* Genetic analyses of interferon pathway-related genes reveal multiple new loci associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **63**, 2049–2057 (2011).
214. Munoz, L. E. *et al.* SLE--a disease of clearance deficiency? *Rheumatol. Oxf. Engl.* **44**, 1101–1107 (2005).
215. Muñoz, L. E. *et al.* Autoimmunity and chronic inflammation - two clearance-related steps in the etiopathogenesis of SLE. *Autoimmun. Rev.* **10**, 38–42 (2010).
216. Rekvig, O. P. & Van der Vlag, J. The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Semin. Immunopathol.* **36**, 301–311 (2014).
217. Kammer, G. M., Perl, A., Richardson, B. C. & Tsokos, G. C. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **46**, 1139–1154 (2002).
218. Shah, K. *et al.* Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **12**, R53 (2010).
219. Konya, C., Paz, Z. & Tsokos, G. C. The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr. Opin. Rheumatol.* **26**, 493–501 (2014).
220. Bird, A. K., Meednu, N. & Anolik, J. H. New insights into B cell biology in systemic lupus erythematosus and Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **27**, 461–467 (2015).

221. Orme, J. & Mohan, C. Macrophages and neutrophils in SLE-An online molecular catalog. *Autoimmun. Rev.* **11**, 365–372 (2012).
222. Smith, C. K. & Kaplan, M. J. The role of neutrophils in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr. Opin. Rheumatol.* **27**, 448–453 (2015).
223. Sarzi-Puttini, P., Atzeni, F., Iaccarino, L. & Doria, A. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity* **38**, 465–472 (2005).
224. Vedove, C. D., Del Giglio, M., Schena, D. & Girolomoni, G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch. Dermatol. Res.* **301**, 99–105 (2009).
225. Hanlon, P., Avenell, A., Aucott, L. & Vickers, M. A. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res. Ther.* **16**, R3 (2014).
226. Fattal, I. *et al.* Epstein-Barr virus antibodies mark systemic lupus erythematosus and scleroderma patients negative for anti-DNA. *Immunology* **141**, 276–285 (2014).
227. Rasmussen, N. S., Draborg, A. H., Nielsen, C. T., Jacobsen, S. & Houen, G. Antibodies to early EBV, CMV, and HHV6 antigens in systemic lupus erythematosus patients. *Scand. J. Rheumatol.* **44**, 143–149 (2015).
228. Yu, X.-X. *et al.* The expression of renal Epstein-Barr virus markers in patients with lupus nephritis. *Exp. Ther. Med.* **7**, 1135–1140 (2014).
229. Ding, Y. *et al.* The expression of EBV-encoded LMP1 in young patients with lupus nephritis. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 6073–6078 (2015).
230. Minamitani, T. *et al.* Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein-Barr virus LMP2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11612–11617 (2015).
231. Draborg, A. H., Duus, K. & Houen, G. Epstein-Barr virus in systemic autoimmune diseases. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, 535738 (2013).
232. Draborg, A. H. *et al.* Reduced response to Epstein-Barr virus antigens by T-cells in systemic lupus erythematosus patients. *Lupus Sci. Med.* **1**, e000015 (2014).
233. Nishimura, K. *et al.* Meta-analysis: diagnostic accuracy of anti-cyclic citrullinated peptide antibody and rheumatoid factor for rheumatoid arthritis. *Ann. Intern. Med.* **146**, 797–808 (2007).
234. Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. & van Venrooij, W. J. Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *J. Clin. Invest.* **101**, 273–281 (1998).
235. Avouac, J., Gossec, L. & Dougados, M. Diagnostic and predictive value of anti-cyclic citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Ann. Rheum. Dis.* **65**, 845–851 (2006).
236. Zeng, Q. Y. *et al.* Rheumatic diseases in China. *Arthritis Res. Ther.* **10**, R17 (2008).
237. MacGregor, A. J. *et al.* Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum.* **43**, 30–37 (2000).
238. Gregersen, P. K., Silver, J. & Winchester, R. J. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **30**, 1205–1213 (1987).
239. Rosloniec, E. F., Ivey, R. A., Whittington, K. B., Kang, A. H. & Park, H.-W. Crystallographic structure of a rheumatoid arthritis MHC susceptibility allele, HLA-DR1 (DRB1\*0101), complexed with the immunodominant determinant of human type II collagen. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **177**, 3884–3892 (2006).
240. Firestein, G. S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* **423**, 356–361 (2003).
241. Raychaudhuri, S. *et al.* Common variants at CD40 and other loci confer risk of rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* **40**, 1216–1223 (2008).
242. Gilroy, C. B., Keat, A. & Taylor-Robinson, D. The prevalence of *Mycoplasma fermentans* in patients with inflammatory arthritides. *Rheumatol. Oxf. Engl.* **40**, 1355–1358 (2001).
243. Askling, J. *et al.* Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. *Arthritis Rheum.* **52**, 1986–1992 (2005).
244. Griffiths, D. J. *et al.* Detection of human retrovirus 5 in patients with arthritis and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **42**, 448–454 (1999).
245. Kozireva, S. V. *et al.* Incidence and clinical significance of parvovirus B19 infection in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **35**, 1265–1270 (2008).

246. Pierer, M. *et al.* Association of anticytomegalovirus seropositivity with more severe joint destruction and more frequent joint surgery in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **64**, 1740–1749 (2012).
247. Balandraud, N., Roudier, J. & Roudier, C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **3**, 362–367 (2004).
248. Winchester, R., Dwyer, E. & Rose, S. The genetic basis of rheumatoid arthritis. The shared epitope hypothesis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **18**, 761–783 (1992).
249. Roudier, J., Petersen, J., Rhodes, G. H., Luka, J. & Carson, D. A. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 5104–5108 (1989).
250. Alspaugh, M. A., Jensen, F. C., Rabin, H. & Tan, E. M. Lymphocytes transformed by Epstein-Barr virus. Induction of nuclear antigen reactive with antibody in rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **147**, 1018–1027 (1978).
251. Alspaugh, M. A., Henle, G., Lennette, E. T. & Henle, W. Elevated levels of antibodies to Epstein-Barr virus antigens in sera and synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Invest.* **67**, 1134–1140 (1981).
252. Lünemann, J. D. *et al.* Increased frequency of EBV-specific effector memory CD8<sup>+</sup> T cells correlates with higher viral load in rheumatoid arthritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 991–1000 (2008).
253. Billings, P. B., Hoch, S. O., White, P. J., Carson, D. A. & Vaughan, J. H. Antibodies to the Epstein-Barr virus nuclear antigen and to rheumatoid arthritis nuclear antigen identify the same polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **80**, 7104–7108 (1983).
254. Ball, R. J., Avenell, A., Aucott, L., Hanlon, P. & Vickers, M. A. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, (2015).
255. Baboonian, C., Venables, P. J., Williams, D. G., Williams, R. O. & Maini, R. N. Cross reaction of antibodies to a glycine/alanine repeat sequence of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 with collagen, cytokeratin, and actin. *Ann. Rheum. Dis.* **50**, 772–775 (1991).
256. Cornillet, M., Verrouil, E., Cantagrel, A., Serre, G. & Nogueira, L. In ACPA-positive RA patients, antibodies to EBNA35-58Cit, a citrullinated peptide from the Epstein-Barr nuclear antigen-1, strongly cross-react with the peptide  $\beta$ 60-74Cit which bears the immunodominant epitope of citrullinated fibrin. *Immunol. Res.* **61**, 117–125 (2015).
257. Fox, R. I. *et al.* Potential role of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **13**, 275–292 (1987).
258. Sin, S.-H. & Dittmer, D. P. Cytokine Homologs of Human Gammaherpesviruses. *J. Interferon Cytokine Res.* **32**, 53–59 (2012).
259. Tosato, G., Steinberg, A. D. & Blaese, R. M. Defective EBV-specific suppressor T-cell function in rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **305**, 1238–1243 (1981).
260. Klatt, T. *et al.* Expansion of peripheral CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in response to Epstein-Barr virus in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **32**, 239–251 (2005).
261. Slaughter, L., Carson, D. A., Jensen, F. C., Holbrook, T. L. & Vaughan, J. H. In vitro effects of Epstein-Barr virus on peripheral blood mononuclear cells from patients with rheumatoid arthritis and normal subjects. *J. Exp. Med.* **148**, 1429–1434 (1978).
262. Depper, J. M., Bluestein, H. G. & Zvaifler, N. J. Impaired regulation of Epstein-Barr virus-induced lymphocyte proliferation in rheumatoid arthritis is due to a T cell defect. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **127**, 1899–1902 (1981).
263. Mousavi-Jazi, M. *et al.* Infrequent detection of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in synovial membrane of patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* **25**, 623–628 (1998).
264. Stahl, H. D. *et al.* Detection of multiple viral DNA species in synovial tissue and fluid of patients with early arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 342–346 (2000).
265. Brousset, P. *et al.* Absence of Epstein-Barr virus carrying cells in synovial membranes and subcutaneous nodules of patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **52**, 608–609 (1993).
266. Niedobitek, G. *et al.* Lack of evidence for an involvement of Epstein-Barr virus infection of synovial membranes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **43**, 151–154 (2000).
267. Croia, C. *et al.* Epstein-Barr virus persistence and infection of autoreactive plasma cells in synovial lymphoid structures in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **72**, 1559–1568 (2013).

268. Carvalho, H., da Silva, J. A. P. & Souto-Carneiro, M. M. Potential roles for CD8(+) T cells in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 401–409 (2013).
269. Carvalho, H., Duarte, C., Silva-Cardoso, S., da Silva, J. A. P. & Souto-Carneiro, M. M. CD8+ T cell profiles in patients with rheumatoid arthritis and their relationship to disease activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **67**, 363–371 (2015).
270. Scotet, E. *et al.* T cell response to Epstein-Barr virus transactivators in chronic rheumatoid arthritis. *J. Exp. Med.* **184**, 1791–1800 (1996).
271. Toussiro, E., Wendling, D., Tiberghien, P., Luka, J. & Roudier, J. Decreased T cell precursor frequencies to Epstein-Barr virus glycoprotein Gp110 in peripheral blood correlate with disease activity and severity in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **59**, 533–538 (2000).
272. Merlini, G. *et al.* A deiminated viral peptide to detect antibodies in rheumatoid arthritis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1050**, 243–249 (2005).
273. Pratesi, F., Tommasi, C., Anzilotti, C., Chimenti, D. & Migliorini, P. Deiminated Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 is a target of anti-citrullinated protein antibodies in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **54**, 733–741 (2006).
274. Johansson, L. *et al.* Antibodies directed against endogenous and exogenous citrullinated antigens pre-date the onset of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **18**, 127 (2016).
275. Sumida, T. *et al.* Clinical practice guideline for Sjögren’s syndrome 2017. *Mod. Rheumatol.* **28**, 383–408 (2018).
276. Moutsopoulos, H. M. Sjögren’s syndrome or autoimmune epithelitis? *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **32**, 199–200 (2007).
277. Kassan, S. S. & Moutsopoulos, H. M. Clinical manifestations and early diagnosis of Sjögren syndrome. *Arch. Intern. Med.* **164**, 1275–1284 (2004).
278. Haugen, A. J. *et al.* Estimation of the prevalence of primary Sjögren’s syndrome in two age-different community-based populations using two sets of classification criteria: the Hordaland Health Study. *Scand. J. Rheumatol.* **37**, 30–34 (2008).
279. Bayetto, K. & Logan, R. M. Sjögren’s syndrome: a review of aetiology, pathogenesis, diagnosis and management. *Aust. Dent. J.* **55 Suppl 1**, 39–47 (2010).
280. Mavragani, C. P. & Moutsopoulos, H. M. The geoepidemiology of Sjögren’s syndrome. *Autoimmun. Rev.* **9**, A305-310 (2010).
281. Vitali, C. *et al.* Classification criteria for Sjögren’s syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. *Ann. Rheum. Dis.* **61**, 554–558 (2002).
282. Haga, H.-J., Naderi, Y., Moreno, A. M. & Peen, E. A study of the prevalence of sicca symptoms and secondary Sjögren’s syndrome in patients with rheumatoid arthritis, and its association to disease activity and treatment profile. *Int. J. Rheum. Dis.* **15**, 284–288 (2012).
283. Shiboski, S. C. *et al.* American College of Rheumatology classification criteria for Sjögren’s syndrome: a data-driven, expert consensus approach in the Sjögren’s International Collaborative Clinical Alliance cohort. *Arthritis Care Res.* **64**, 475–487 (2012).
284. Yamamoto, K. Pathogenesis of Sjögren’s syndrome. *Autoimmun. Rev.* **2**, 13–18 (2003).
285. Brito-Zerón, P. *et al.* Sjögren syndrome. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16047 (2016).
286. Manganelli, P. & Fietta, P. Apoptosis and Sjögren syndrome. *Semin. Arthritis Rheum.* **33**, 49–65 (2003).
287. Okuma, A. *et al.* Enhanced apoptosis by disruption of the STAT3-IκB-ζ signaling pathway in epithelial cells induces Sjögren’s syndrome-like autoimmune disease. *Immunity* **38**, 450–460 (2013).
288. Russell, J. H. & Ley, T. J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 323–370 (2002).
289. Youinou, P., Devauchelle-Pensec, V. & Pers, J.-O. Significance of B cells and B cell clonality in Sjögren’s syndrome. *Arthritis Rheum.* **62**, 2605–2610 (2010).
290. Matsumura, R. *et al.* Interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induce Fas expression and anti-Fas mediated apoptosis in a salivary ductal cell line. *Clin. Exp. Rheumatol.* **18**, 311–318 (2000).
291. Varin, M.-M. *et al.* In Sjögren’s syndrome, B lymphocytes induce epithelial cells of salivary glands into apoptosis through protein kinase C delta activation. *Autoimmun. Rev.* **11**, 252–258 (2012).

292. Tzioufas, A. G., Kapsogeorgou, E. K. & Moutsopoulos, H. M. Pathogenesis of Sjögren's syndrome: what we know and what we should learn. *J. Autoimmun.* **39**, 4–8 (2012).
293. Op De Beéck, K. *et al.* Antinuclear antibody detection by automated multiplex immunoassay in untreated patients at the time of diagnosis. *Autoimmun. Rev.* **12**, 137–143 (2012).
294. Iaccarino, L. *et al.* Anti-annexins autoantibodies: their role as biomarkers of autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **10**, 553–558 (2011).
295. Haneji, N. *et al.* Identification of alpha-fodrin as a candidate autoantigen in primary Sjögren's syndrome. *Science* **276**, 604–607 (1997).
296. Hansen, A., Lipsky, P. E. & Dörner, T. New concepts in the pathogenesis of Sjögren syndrome: many questions, fewer answers. *Curr. Opin. Rheumatol.* **15**, 563–570 (2003).
297. Harley, J. B. *et al.* Gene interaction at HLA-DQ enhances autoantibody production in primary Sjögren's syndrome. *Science* **232**, 1145–1147 (1986).
298. Rischmueller, M. *et al.* HLA class II phenotype controls diversification of the autoantibody response in primary Sjögren's syndrome (pSS). *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 365–371 (1998).
299. Moriyama, M. *et al.* Cytokine/chemokine profiles contribute to understanding the pathogenesis and diagnosis of primary Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* **169**, 17–26 (2012).
300. Bouma, H. R. *et al.* Aging and Immunopathology in Primary Sjögren's Syndrome. *Curr. Aging Sci.* **8**, 202–213 (2015).
301. Liu, K. *et al.* X Chromosome Dose and Sex Bias in Autoimmune Diseases: Increased Prevalence of 47,XXX in Systemic Lupus Erythematosus and Sjögren's Syndrome. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 1290–1300 (2016).
302. de Paiva, C. S. *et al.* Altered Mucosal Microbiome Diversity and Disease Severity in Sjögren Syndrome. *Sci. Rep.* **6**, 23561 (2016).
303. Zheng, L. *et al.* Association between IFN-alpha and primary Sjögren's syndrome. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **107**, e12-18 (2009).
304. Emamian, E. S. *et al.* Peripheral blood gene expression profiling in Sjögren's syndrome. *Genes Immun.* **10**, 285–296 (2009).
305. Yao, Y., Liu, Z., Jallal, B., Shen, N. & Rönnblom, L. Type I interferons in Sjögren's syndrome. *Autoimmun. Rev.* **12**, 558–566 (2013).
306. Rönnblom, L. & Eloranta, M.-L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 248–253 (2013).
307. Borden, E. C. *et al.* Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat. Rev. Drug Discov.* **6**, 975–990 (2007).
308. Siegal, F. P. *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835–1837 (1999).
309. Rönnblom, L., Eloranta, M.-L. & Alm, G. V. Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* **36**, 463–472 (2003).
310. Igoe, A. & Scofield, R. H. Autoimmunity and infection in Sjögren's syndrome. *Curr. Opin. Rheumatol.* **25**, 480–487 (2013).
311. Nakamura, H. *et al.* HTLV-I infection results in resistance toward salivary gland destruction of Sjögren's syndrome. *Clin. Exp. Rheumatol.* **26**, 653–655 (2008).
312. Chen, M.-H. *et al.* Clinical significance of chronic hepatitis B virus infection in patients with primary Sjögren's syndrome. *Clin. Rheumatol.* **31**, 309–315 (2012).
313. Sipsas, N. V., Gamaletsou, M. N. & Moutsopoulos, H. M. Is Sjögren's syndrome a retroviral disease? *Arthritis Res. Ther.* **13**, 212 (2011).
314. Voulgarelis, M. & Moutsopoulos, H. M. Mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma in Sjögren's syndrome: risks, management, and prognosis. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* **34**, 921–933, viii (2008).
315. Inoue, N., Harada, S., Miyasaka, N., Oya, A. & Yanagi, K. Analysis of antibody titers to Epstein-Barr virus nuclear antigens in sera of patients with Sjögren's syndrome and with rheumatoid arthritis. *J. Infect. Dis.* **164**, 22–28 (1991).
316. Fox, R. I., Luppi, M., Kang, H. I. & Pisa, P. Reactivation of Epstein-Barr virus in Sjögren's syndrome. *Springer Semin. Immunopathol.* **13**, 217–231 (1991).

317. Pasoto, S. G. *et al.* EBV reactivation serological profile in primary Sjögren's syndrome: an underlying trigger of active articular involvement? *Rheumatol. Int.* **33**, 1149–1157 (2013).
318. Nagata, Y. *et al.* Activation of Epstein-Barr virus by saliva from Sjogren's syndrome patients. *Immunology* **111**, 223–229 (2004).
319. Inoue, H. *et al.* Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of EBV reactivation as a risk factor for Sjögren's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **188**, 4654–4662 (2012).
320. Navone, R. *et al.* Identification of tear lipocalin as a novel autoantigen target in Sjögren's syndrome. *J. Autoimmun.* **25**, 229–234 (2005).
321. Inoue, H. *et al.* Possible involvement of EBV-mediated alpha-fodrin cleavage for organ-specific autoantigen in Sjogren's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **166**, 5801–5809 (2001).
322. Fox, R. I., Pearson, G. & Vaughan, J. H. Detection of Epstein-Barr virus-associated antigens and DNA in salivary gland biopsies from patients with Sjogren's syndrome. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **137**, 3162–3168 (1986).
323. Wen, S. *et al.* Association of Epstein-Barr virus (EBV) with Sjögren's syndrome: differential EBV expression between epithelial cells and lymphocytes in salivary glands. *Am. J. Pathol.* **149**, 1511–1517 (1996).
324. Pflugfelder, S. C. *et al.* Epstein-Barr virus and the lacrimal gland pathology of Sjögren's syndrome. *Am. J. Pathol.* **143**, 49–64 (1993).
325. Appel, S. *et al.* Potential association of muscarinic receptor 3 gene variants with primary Sjogren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **70**, 1327–1329 (2011).
326. Ice, J. A. *et al.* Genetics of Sjögren's syndrome in the genome-wide association era. *J. Autoimmun.* **39**, 57–63 (2012).
327. Wilson E. On lichen planus. *J Cutan Med Dis Skin* (1869).
328. Thibierge G. Des lésions de la muqueuse buccale dans le lichen plan. *Ann de Dermatol* (1885).
329. Wickham L. Sur un signe pathognomonique du lichen de Wilson (lichen plan). *Ann Dermatol Syphiligr* (1895).
330. Dubreuilh W. Histologie du lichen plan des muqueuses. *Ann Dermatol* (1906).
331. Chbicheb S & El Wady W. Lichen plan buccal. *EMC - Chir Orale Maxillo-Faciale* (2008).
332. McCreary, C. E. & McCartan, B. E. Clinical management of oral lichen planus. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **37**, 338–343 (1999).
333. Gupta, S. & Jawanda, M. K. Oral Lichen Planus: An Update on Etiology, Pathogenesis, Clinical Presentation, Diagnosis and Management. *Indian J. Dermatol.* **60**, 222–229 (2015).
334. Brown, R. S., Bottomley, W. K., Puente, E. & Lavigne, G. J. A retrospective evaluation of 193 patients with oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **22**, 69–72 (1993).
335. Alam, F. & Hamburger, J. Oral mucosal lichen planus in children. *Int. J. Paediatr. Dent.* **11**, 209–214 (2001).
336. Laeijendecker, R., Van Joost, T., Tank, B., Oranje, A. P. & Neumann, H. A. M. Oral lichen planus in childhood. *Pediatr. Dermatol.* **22**, 299–304 (2005).
337. Kleinman, D. V., Swango, P. A. & Niessen, L. C. Epidemiologic studies of oral mucosal conditions--methodologic issues. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **19**, 129–140 (1991).
338. McCartan, B. E. & Healy, C. M. The reported prevalence of oral lichen planus: a review and critique. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **37**, 447–453 (2008).
339. Axéll, T. & Rundquist, L. Oral lichen planus--a demographic study. *Community Dent. Oral Epidemiol.* **15**, 52–56 (1987).
340. Ismail, S. B., Kumar, S. K. S. & Zain, R. B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J. Oral Sci.* **49**, 89–106 (2007).
341. Thorn, J. J., Holmstrup, P., Rindum, J. & Pindborg, J. J. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. *J. Oral Pathol.* **17**, 213–218 (1988).
342. Mollaoglu, N. Oral lichen planus: a review. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* **38**, 370–377 (2000).
343. Silverman, S., Gorsky, M. & Lozada-Nur, F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission, and malignant association. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **60**, 30–34 (1985).
344. Torrente-Castells, E., Figueiredo, R., Berini-Aytés, L. & Gay-Escoda, C. Clinical features of oral lichen planus. A retrospective study of 65 cases. *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal* **15**, e685-690 (2010).

345. Boorghani, M., Gholizadeh, N., Taghavi Zenouz, A., Vatankhah, M. & Mehdipour, M. Oral lichen planus: clinical features, etiology, treatment and management; a review of literature. *J. Dent. Res. Dent. Clin. Dent. Prospects* **4**, 3–9 (2010).
346. Al-Hashimi, I. *et al.* Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **103 Suppl**, S25.e1-12 (2007).
347. Scully, C. *et al.* Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **9**, 86–122 (1998).
348. Bagán-Sebastián, J. V., Milián-Masanet, M. A., Peñarrocha-Diago, M. & Jiménez, Y. A clinical study of 205 patients with oral lichen planus. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **50**, 116–118 (1992).
349. Andreasen, J. O. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **25**, 31–42 (1968).
350. Samson J, Carrel JP & Gabioud F. Le lichen plan buccal. *Rev Méd Suisse Romande* (1998).
351. López-Jornet, P. & Camacho-Alonso, F. Quality of life in patients with oral lichen planus. *J. Eval. Clin. Pract.* **16**, 111–113 (2010).
352. Karbach, J., Al-Nawas, B., Moergel, M. & Daubländer, M. Oral health-related quality of life of patients with oral lichen planus, oral leukoplakia, or oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **72**, 1517–1522 (2014).
353. van der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* **45**, 317–323 (2009).
354. Cheng, Y.-S. L., Gould, A., Kurago, Z., Fantasia, J. & Muller, S. Diagnosis of oral lichen planus: a position paper of the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* **122**, 332–354 (2016).
355. Ingafou, M., Leao, J. C., Porter, S. R. & Scully, C. Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis.* **12**, 463–468 (2006).
356. Seintou A, Gaydarov N & Lombardi T. Histoire naturelle et transformation maligne du lichen plan buccal. 1 ère partie: mise au point. *Med Buccale Chri Buccale.* (2012).
357. Gerber C, Lucas C, Sourdot A, Kirchner S & Bravetti P. Le lichen plan gingival érosif: à propos de 3 cas. *Actual Odontostomatol.* (2009).
358. Brant, J. M. C., Aguiar, M. C. F., Grandinetti, H. A. M., Rodrigues, L. V. & Vasconcelos, A. C. A comparative study of apoptosis in reticular and erosive oral lichen planus. *Braz. Dent. J.* **23**, 564–569 (2012).
359. Kuffer R, Lombardi T, Husson-Bui C, Courrier B & Samson J. La muqueuse buccale : de la clinique au traitement. *Med'Com* (2009).
360. Hallopeau H. Sur un cas de lichen de Wilson gingival avec néoplasie voisine dans la région maxillaire. *Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr* (1910).
361. Mignogna, M. D. *et al.* Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. *Oral Oncol.* **37**, 262–267 (2001).
362. Bombeccari, G. P. *et al.* Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **112**, 328–334 (2011).
363. Holmstrup, P., Thorn, J. J., Rindum, J. & Pindborg, J. J. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosa. *J. Oral Pathol.* **17**, 219–225 (1988).
364. Fitzpatrick, S. G., Hirsch, S. A. & Gordon, S. C. The malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a systematic review. *J. Am. Dent. Assoc.* **145**, 45–56 (2014).
365. van der Waal, I. Oral potentially malignant disorders: is malignant transformation predictable and preventable? *Med. Oral Patol. Oral Cirurgia Bucal* **19**, e386-390 (2014).
366. Eisenberg, E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J. Oral Maxillofac. Surg. Off. J. Am. Assoc. Oral Maxillofac. Surg.* **58**, 1278–1285 (2000).
367. Lo Muzio, L. *et al.* The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol.* **34**, 239–246 (1998).
368. Sigurgeirsson, B. & Lindelöf, B. Lichen planus and malignancy. An epidemiologic study of 2071 patients and a review of the literature. *Arch. Dermatol.* **127**, 1684–1688 (1991).

369. Cortés-Ramírez, D.-A., Gainza-Cirauqui, M.-L., Echebarria-Goikouria, M.-A. & Aguirre-Urizar, J. M. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown. *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal* **14**, E118-122 (2009).
370. Montebugnoli, L. *et al.* High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **35**, 1140–1144 (2006).
371. van der Meij, E. H. *et al.* A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **88**, 307–310 (1999).
372. van der Meij, E. H., Mast, H. & van der Waal, I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral Oncol.* **43**, 742–748 (2007).
373. Mares, S., Ben Slama, L., Gruffaz, F., Goudot, P. & Bertolus, C. [Potentially malignant character of oral lichen planus and lichenoid lesions]. *Rev. Stomatol. Chir. Maxillo-Faciale Chir. Orale* **114**, 293–298 (2013).
374. Mignogna, M. D. *et al.* Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. *Eur. J. Surg. Oncol. J. Eur. Soc. Surg. Oncol. Br. Assoc. Surg. Oncol.* **28**, 838–843 (2002).
375. van der Meij, E. H. & van der Waal, I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **32**, 507–512 (2003).
376. Mignogna, M. D., Fedele, S. & Lo Russo, L. Dysplasia/neoplasia surveillance in oral lichen planus patients: a description of clinical criteria adopted at a single centre and their impact on prognosis. *Oral Oncol.* **42**, 819–824 (2006).
377. Poljacki, M. *et al.* [Psoriasis and autoimmune skin disorders]. *Med. Pregl.* **55**, 325–328 (2002).
378. Lo Muzio, L., Santarelli, A., Campisi, G., Lacaíta, M. & Favia, G. Possible link between Hashimoto's thyroiditis and oral lichen planus: a novel association found. *Clin. Oral Investig.* **17**, 333–336 (2013).
379. Compilato, D., Carroccio, A. & Campisi, G. Hidden coeliac disease in patients suffering from oral lichen planus. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **26**, 390–391 (2012).
380. Tsuboi, H. & Katsuoka, K. Ulcerative lichen planus associated with Sjögren's syndrome. *J. Dermatol.* **34**, 131–134 (2007).
381. Likar-Manookin, K. *et al.* Prevalence of oral lesions of autoimmune etiology in patients with primary Sjogren's syndrome. *Oral Dis.* **19**, 598–603 (2013).
382. Gregersen, P. K. & Olsson, L. M. Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 363–391 (2009).
383. Zennewicz, L. A., Abraham, C., Flavell, R. A. & Cho, J. H. Unraveling the genetics of autoimmunity. *Cell* **140**, 791–797 (2010).
384. Marson, A., Housley, W. J. & Hafler, D. A. Genetic basis of autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2234–2241 (2015).
385. Scully, C., Eisen, D. & Carrozzo, M. Management of oral lichen planus. *Am. J. Clin. Dermatol.* **1**, 287–306 (2000).
386. Lavanya, N., Jayanthi, P., Rao, U. K. & Ranganathan, K. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* **15**, 127–132 (2011).
387. Lodi, G. *et al.* Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 1. Viral infections and etiopathogenesis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **100**, 40–51 (2005).
388. Thongprasom, K., Carrozzo, M., Furness, S. & Lodi, G. Interventions for treating oral lichen planus. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001168 (2011). doi:10.1002/14651858.CD001168.pub2
389. Nicolaides, N. C., Charmandari, E., Chrousos, G. P. & Kino, T. Recent advances in the molecular mechanisms determining tissue sensitivity to glucocorticoids: novel mutations, circadian rhythm and ligand-induced repression of the human glucocorticoid receptor. *BMC Endocr. Disord.* **14**, 71 (2014).
390. Cheng, S. *et al.* Interventions for erosive lichen planus affecting mucosal sites. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD008092 (2012). doi:10.1002/14651858.CD008092.pub2
391. O'Neill, I. D. & Scully, C. Biologics in oral medicine: ulcerative disorders. *Oral Dis.* **19**, 37–45 (2013).
392. Arduino, P. G. *et al.* Pimecrolimus vs. tacrolimus for the topical treatment of unresponsive oral erosive lichen planus: a 8 week randomized double-blind controlled study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **28**, 475–482 (2014).

393. Gupta, S., Ghosh, S. & Gupta, S. Interventions for the management of oral lichen planus: a review of the conventional and novel therapies. *Oral Dis.* **23**, 1029–1042 (2017).
394. Presland, R. B. & Dale, B. A. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **11**, 383–408 (2000).
395. Presland, R. B. & Jurevic, R. J. Making sense of the epithelial barrier: what molecular biology and genetics tell us about the functions of oral mucosal and epidermal tissues. *J. Dent. Educ.* **66**, 564–574 (2002).
396. Walker, D. M. Identification of subpopulations of lymphocytes and macrophages in the infiltrate of lichen planus lesions of skin and oral mucosa. *Br. J. Dermatol.* **94**, 529–534 (1976).
397. Shklar, G., Flynn, E. & Szabo, G. Basement membrane alterations in oral lichen planus. *J. Invest. Dermatol.* **70**, 45–50 (1978).
398. Fernández-González, F. *et al.* Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. *Med. Oral Patol. Oral Cirugia Bucal* **16**, e641–646 (2011).
399. Burgdorf, W. H. C. & Plewig, G. Who described Civatte bodies? *J. Cutan. Pathol.* **41**, 340–346 (2014).
400. Karatsaidis, A., Schreurs, O., Helgeland, K., Axéll, T. & Schenck, K. Erythematous and reticular forms of oral lichen planus and oral lichenoid reactions differ in pathological features related to disease activity. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **32**, 275–281 (2003).
401. Aminzadeh, A., Jahanshahi, G. & Ahmadi, M. A retrospective comparative study on clinico-pathologic features of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *Dent. Res. J.* **10**, 168–172 (2013).
402. Boisnic, S., Frances, C., Branchet, M. C., Szpirglas, H. & Le Charpentier, Y. Immunohistochemical study of oral lesions of lichen planus: diagnostic and pathophysiologic aspects. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **70**, 462–465 (1990).
403. Lombardi, T. & Küffer, R. [Dynamic concept of oral lichen planus. The diagnosis easy at early stages may become difficult in ancient lichen planus]. *Presse Medicale Paris Fr.* **1983** **45**, 227–239 (2016).
404. Laskaris, G., Sklavounou, A. & Angelopoulos, A. Direct immunofluorescence in oral lichen planus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **53**, 483–487 (1982).
405. Crincoli, V. *et al.* Oral lichen planus: update on etiopathogenesis, diagnosis and treatment. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **33**, 11–20 (2011).
406. Lowe, N. J., Cudworth, A. G. & Woodrow, J. C. HL-A antigens in lichen planus. *Br. J. Dermatol.* **95**, 169–171 (1976).
407. Watanabe, T., Ohishi, M., Tanaka, K. & Sato, H. Analysis of HLA antigens in Japanese with oral lichen planus. *J. Oral Pathol.* **15**, 529–533 (1986).
408. Porter, S. R., Kirby, A., Olsen, I. & Barrett, W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus: a review. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **83**, 358–366 (1997).
409. Bai, J. *et al.* Association of polymorphisms in the human IFN-gamma and IL-4 gene with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **28**, 351–358 (2008).
410. Xavier, G. M., de Sá, A. R., Guimarães, A. L. S., da Silva, T. A. & Gomez, R. S. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **36**, 476–481 (2007).
411. Dan, H. *et al.* Association of interleukin-8 gene polymorphisms and haplotypes with oral lichen planus in a Chinese population. *Inflammation* **33**, 76–81 (2010).
412. Bai, J. *et al.* Association of polymorphisms in the tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 genes with oral lichen planus: a study in a chinese cohort with Han ethnicity. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* **29**, 381–388 (2009).
413. Bai, J. *et al.* Interleukin-18 gene polymorphisms and haplotypes in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese cohort. *Tissue Antigens* **70**, 390–397 (2007).
414. Carrozzo, M. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J. Invest. Dermatol.* **122**, 87–94 (2004).
415. Kimkong, I., Hirankarn, N., Nakkuntod, J. & Kitkumthorn, N. Tumour necrosis factor-alpha gene polymorphisms and susceptibility to oral lichen planus. *Oral Dis.* **17**, 206–209 (2011).

416. Raybaud, H. *et al.* Epstein-Barr Virus-Infected Plasma Cells Infiltrate Erosive Oral Lichen Planus. *J. Dent. Res.* 22034518788282 (2018). doi:10.1177/0022034518788282
417. Gheorghe, C., Mihai, L., Parlatescu, I. & Tovu, S. Association of oral lichen planus with chronic C hepatitis. Review of the data in literature. *Maedica* **9**, 98–103 (2014).
418. Lodi, G., Pellicano, R. & Carrozzo, M. Hepatitis C virus infection and lichen planus: a systematic review with meta-analysis. *Oral Dis.* **16**, 601–612 (2010).
419. Baek, K. & Choi, Y. The microbiology of oral lichen planus: Is microbial infection the cause of oral lichen planus? *Mol. Oral Microbiol.* **33**, 22–28 (2018).
420. Carrozzo, M. & Carozzo, M. Oral health in patients with hepatitis C virus infection: an underestimated problem? *Oral Dis.* **7**, 267–270 (2001).
421. Nagao, Y., Kawaguchi, T., Ide, T., Kumashiro, R. & Sata, M. Exacerbation of oral erosive lichen planus by combination of interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Int. J. Mol. Med.* **15**, 237–241 (2005).
422. Grossmann, S. de M. C., Teixeira, R., de Aguiar, M. C. F. & do Carmo, M. A. V. Exacerbation of oral lichen planus lesions during treatment of chronic hepatitis C with pegylated interferon and ribavirin. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **20**, 702–706 (2008).
423. Nagao, Y., Kimura, K., Kawahigashi, Y. & Sata, M. Successful Treatment of Hepatitis C Virus-associated Oral Lichen Planus by Interferon-free Therapy with Direct-acting Antivirals. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **7**, e179 (2016).
424. Viguier, M. *et al.* Peripheral and local human papillomavirus 16-specific CD8+ T-cell expansions characterize erosive oral lichen planus. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 418–424 (2015).
425. Campisi, G. *et al.* HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **98**, 705–711 (2004).
426. Pedersen, A. Abnormal EBV immune status in oral lichen planus. *Oral Dis.* **2**, 125–128 (1996).
427. Walsh, L. J., Savage, N. W., Ishii, T. & Seymour, G. J. Immunopathogenesis of oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **19**, 389–396 (1990).
428. Sand, L. P., Jalouli, J., Larsson, P.-A. & Hirsch, J.-M. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **93**, 586–592 (2002).
429. Vieira, R. da R. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in different sources of materials from patients with oral lichen planus: a case-control study. *J. Clin. Pathol.* **69**, 358–363 (2016).
430. Yildirim, B., Sengüven, B. & Demir, C. Prevalence of herpes simplex, Epstein Barr and human papilloma viruses in oral lichen planus. *Med. Oral Patol. Oral Cirurgia Bucal* **16**, e170-174 (2011).
431. Sun, A. *et al.* Preliminary evidence for an association of Epstein-Barr virus with pre-ulcerative oral lesions in patients with recurrent aphthous ulcers or Behçet's disease. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **27**, 168–175 (1998).
432. OFlatharta, C., Flint, S. R., Toner, M., Butler, D. & Mabruk, M. J. E. M. F. Investigation into a possible association between oral lichen planus, the human herpesviruses, and the human papillomaviruses. *Mol. Diagn. J. Devoted Underst. Hum. Dis. Clin. Appl. Mol. Biol.* **7**, 73–83 (2003).
433. Sugerman, P. B. & Savage, N. W. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Aust. Dent. J.* **47**, 290–297 (2002).
434. Simark-Mattsson, C., Bergenholtz, G., Jontell, M., Tarkowski, A. & Dahlgren, U. I. T cell receptor V-gene usage in oral lichen planus; increased frequency of T cell receptors expressing V alpha 2 and V beta 3. *Clin. Exp. Immunol.* **98**, 503–507 (1994).
435. Khudhur, A. S., Di Zenzo, G. & Carrozzo, M. Oral lichenoid tissue reactions: diagnosis and classification. *Expert Rev. Mol. Diagn.* **14**, 169–184 (2014).
436. Eversole, L. R. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. *Semin. Cutan. Med. Surg.* **16**, 284–294 (1997).
437. Zhou, X. J., Sugerman, P. B., Savage, N. W., Walsh, L. J. & Seymour, G. J. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **31**, 23–27 (2002).

438. Ammar, M. *et al.* Involvement of granzyme B and granulysin in the cytotoxic response in lichen planus. *J. Cutan. Pathol.* **35**, 630–634 (2008).
439. Sugerman, P. B., Savage, N. W., Xu, L. J., Walsh, L. J. & Seymour, G. J. Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **24**, 1–8 (1995).
440. Rose, N. R. & Bona, C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol. Today* **14**, 426–430 (1993).
441. Sugerman, P. B., Savage, N. W. & Seymour, G. J. Clonal expansion of lymphocytes from oral lichen planus lesions. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **22**, 126–131 (1993).
442. Sugerman, P. B. *et al.* The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* **13**, 350–365 (2002).
443. Jungell, P., Kontinen, Y. T. & Malmström, M. Basement membrane changes in oral lichen planus. *Proc. Finn. Dent. Soc. Suom. Hammaslaakariseuran Toim.* **85**, 119–124 (1989).
444. Marinkovich, M. P., Keene, D. R., Rimberg, C. S. & Burgeson, R. E. Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **197**, 255–267 (1993).
445. Pullan, S. *et al.* Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J. Cell Sci.* **109** (Pt 3), 631–642 (1996).
446. Zhao, Z. Z., Sugerman, P. B., Zhou, X. J., Walsh, L. J. & Savage, N. W. Mast cell degranulation and the role of T cell RANTES in oral lichen planus. *Oral Dis.* **7**, 246–251 (2001).
447. Moss, M. L. *et al.* Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* **385**, 733–736 (1997).
448. Itai, T., Tanaka, M. & Nagata, S. Processing of tumor necrosis factor by the membrane-bound TNF- $\alpha$ -converting enzyme, but not its truncated soluble form. *Eur. J. Biochem.* **268**, 2074–2082 (2001).
449. Mazzarella, N., Femiano, F., Gombos, F., De Rosa, A. & Giuliano, M. Matrix metalloproteinase gene expression in oral lichen planus: erosive vs. reticular forms. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV* **20**, 953–957 (2006).
450. Zhao, Z. Z., Savage, N. W., Pujic, Z. & Walsh, L. J. Immunohistochemical localization of mast cells and mast cell-nerve interactions in oral lichen planus. *Oral Dis.* **3**, 71–76 (1997).
451. Mignogna, M. D., Fedele, S., Lo Russo, L., Lo Muzio, L. & Bucci, E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncol.* **40**, 120–130 (2004).
452. Lukac, J. *et al.* Serum autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with oral lichen planus. *Croat. Med. J.* **47**, 53–58 (2006).
453. Loe, H., Theilade, E. & Jensen, S. B. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *J. Periodontol.* **36**, 177–187 (1965).
454. Repeke, C. E. *et al.* Non-inflammatory destructive periodontal disease: a clinical, microbiological, immunological and genetic investigation. *J. Appl. Oral Sci. Rev. FOB* **20**, 113–121 (2012).
455. Armitage, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann. Periodontol.* **4**, 1–6 (1999).
456. Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. Periodontal diseases. *Lancet Lond. Engl.* **366**, 1809–1820 (2005).
457. Bourgeois, D., Bouchard, P. & Mattout, C. Epidemiology of periodontal status in dentate adults in France, 2002–2003. *J. Periodontol. Res.* **42**, 219–227 (2007).
458. Demmer, R. T. & Papapanou, P. N. Epidemiologic patterns of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol. 2000* **53**, 28–44 (2010).
459. König, J., Holtfreter, B. & Kocher, T. Periodontal health in Europe: future trends based on treatment needs and the provision of periodontal services--position paper 1. *Eur. J. Dent. Educ. Off. J. Assoc. Dent. Educ. Eur.* **14** Suppl 1, 4–24 (2010).
460. Eke, P. I. *et al.* Update on Prevalence of Periodontitis in Adults in the United States: NHANES 2009 to 2012. *J. Periodontol.* **86**, 611–622 (2015).
461. Eke, P. I. & Dye, B. Assessment of self-report measures for predicting population prevalence of periodontitis. *J. Periodontol.* **80**, 1371–1379 (2009).

462. Løe, H. The Gingival Index, the Plaque Index and the Retention Index Systems. *J. Periodontol.* **38**, Suppl:610-616 (1967).
463. Page, R. C. & Schroeder, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **34**, 235–249 (1976).
464. Pierrard L, Braux J, Chatté F, Jourdain ML & Svoboda JM. Étiopathogénie des maladies parodontales. *EMC - Médecine buccale* (2015).
465. Silva, M. F. *et al.* Is periodontitis associated with halitosis? A systematic review and meta-regression analysis. *J. Clin. Periodontol.* **44**, 1003–1009 (2017).
466. Irani, F. C., Wassall, R. R. & Preshaw, P. M. Impact of periodontal status on oral health-related quality of life in patients with and without type 2 diabetes. *J. Dent.* **43**, 506–511 (2015).
467. Goel, K. & Baral, D. A Comparison of Impact of Chronic Periodontal Diseases and Nonsurgical Periodontal Therapy on Oral Health-Related Quality of Life. *Int. J. Dent.* **2017**, 9352562 (2017).
468. He, S., Wei, S., Wang, J. & Ji, P. Chronic periodontitis and oral health-related quality of life in Chinese adults: A population-based, cross-sectional study. *J. Periodontol.* **89**, 275–284 (2018).
469. Levin, L. *et al.* Demographic profile, Oral Health Impact Profile and Dental Anxiety Scale in patients with chronic periodontitis: a case-control study. *Int. Dent. J.* **68**, 269–278 (2018).
470. Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E. & working group 1 of the joint EFP/AAP workshop. Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J. Periodontol.* **84**, S24-29 (2013).
471. Martin-Cabezas, R. *et al.* Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. *Am. Heart J.* **180**, 98–112 (2016).
472. Almeida, A. P. C. P. S. C., Fagundes, N. C. F., Maia, L. C. & Lima, R. R. Is there an Association Between Periodontitis and Atherosclerosis in Adults? A Systematic Review. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **16**, 569–582 (2018).
473. Scannapieco, F. A., Papandonatos, G. D. & Dunford, R. G. Associations between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population. *Ann. Periodontol.* **3**, 251–256 (1998).
474. Scannapieco, F. A. & Ho, A. W. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J. Periodontol.* **72**, 50–56 (2001).
475. Bansal, M., Rastogi, S. & Vineeth, N. S. Influence of periodontal disease on systemic disease: inversion of a paradigm: a review. *J. Med. Life* **6**, 126–130 (2013).
476. Ebersole, J. L., Holt, S. C., Hansard, R. & Novak, M. J. Microbiologic and immunologic characteristics of periodontal disease in Hispanic americans with type 2 diabetes. *J. Periodontol.* **79**, 637–646 (2008).
477. Barnes, V. M. *et al.* Global metabolomic analysis of human saliva and plasma from healthy and diabetic subjects, with and without periodontal disease. *PLoS One* **9**, e105181 (2014).
478. Preshaw, P. M. *et al.* Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia* **55**, 21–31 (2012).
479. Casanova, L., Hughes, F. J. & Preshaw, P. M. Diabetes and periodontal disease: a two-way relationship. *Br. Dent. J.* **217**, 433–437 (2014).
480. Sanz, M. *et al.* Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the International Diabetes Federation and the European Federation of Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* **45**, 138–149 (2018).
481. Ide, M. *et al.* Periodontitis and Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease. *PLoS One* **11**, e0151081 (2016).
482. Ganesh, P., Karthikeyan, R., Muthukumaraswamy, A. & Anand, J. A Potential Role of Periodontal Inflammation in Alzheimer’s Disease: A Review. *Oral Health Prev. Dent.* **15**, 7–12 (2017).
483. Nabet, C. *et al.* Maternal periodontitis and the causes of preterm birth: the case-control Epipap study. *J. Clin. Periodontol.* **37**, 37–45 (2010).
484. Moura da Silva, G., Coutinho, S. B., Piscocoy, M. D. B. V., Ximenes, R. A. A. & Jamelli, S. R. Periodontitis as a risk factor for preeclampsia. *J. Periodontol.* **83**, 1388–1396 (2012).
485. Michaud, D. S., Fu, Z., Shi, J. & Chung, M. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiol. Rev.* **39**, 49–58 (2017).
486. Michaud, D. S. *et al.* Periodontal Disease Assessed Using Clinical Dental Measurements and Cancer Risk in the ARIC Study. *J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 843–854 (2018).

487. Bullman, S. *et al.* Analysis of Fusobacterium persistence and antibiotic response in colorectal cancer. *Science* **358**, 1443–1448 (2017).
488. Araújo, V. M. A., Melo, I. M. & Lima, V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. *Mediators Inflamm.* **2015**, 259074 (2015).
489. Viatte, S., Plant, D. & Raychaudhuri, S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.* **9**, 141–153 (2013).
490. de Aquino, S. G. *et al.* Periodontal pathogens directly promote autoimmune experimental arthritis by inducing a TLR2- and IL-1-driven Th17 response. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **192**, 4103–4111 (2014).
491. Lundberg, K. *et al.* Antibodies to citrullinated alpha-enolase peptide 1 are specific for rheumatoid arthritis and cross-react with bacterial enolase. *Arthritis Rheum.* **58**, 3009–3019 (2008).
492. Li, S. *et al.* Autoantibodies From Single Circulating Plasmablasts React With Citrullinated Antigens and Porphyromonas gingivalis in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ* **68**, 614–626 (2016).
493. Huang, L.-G., Chen, G., Chen, D.-Y. & Chen, H.-H. Factors associated with the risk of gingival disease in patients with rheumatoid arthritis. *PLoS One* **12**, e0186346 (2017).
494. Cosgarea, R. *et al.* Effects of non-surgical periodontal therapy on periodontal laboratory and clinical data as well as on disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Oral Investig.* (2018). doi:10.1007/s00784-018-2420-3
495. Bouchard, Philippe. Parodontologie & Dentisterie Implantaire. Volume 1: Médecine Parodontale. Lavoisier Médecine, France. *Lavoisier Médecine* **1**, (2015).
496. Segelnick, S. L. & Weinberg, M. A. Reevaluation of initial therapy: when is the appropriate time? *J. Periodontol.* **77**, 1598–1601 (2006).
497. Arumugam, M. *et al.* Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **473**, 174–180 (2011).
498. Yamashita, Y. & Takeshita, T. The oral microbiome and human health. *J. Oral Sci.* **59**, 201–206 (2017).
499. Hoare, A., Marsh, P. D. & Diaz, P. I. Ecological Therapeutic Opportunities for Oral Diseases. *Microbiol. Spectr.* **5**, (2017).
500. Kilian, M. *et al.* The oral microbiome - an update for oral healthcare professionals. *Br. Dent. J.* **221**, 657–666 (2016).
501. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol.* **63**, 322–331 (1992).
502. Paster, B. J. & Dewhirst, F. E. Molecular microbial diagnosis. *Periodontol. 2000* **51**, 38–44 (2009).
503. Keijsers, B. J. F. *et al.* Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J. Dent. Res.* **87**, 1016–1020 (2008).
504. Slots, J. Systemic antibiotics in periodontics. *J. Periodontol.* **75**, 1553–1565 (2004).
505. Socransky, S. S. & Haffajee, A. D. Periodontal microbial ecology. *Periodontol. 2000* **38**, 135–187 (2005).
506. Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C. & Kent, R. L. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**, 134–144 (1998).
507. Ma, Y., Zhang, T., Jiang, Y. & Liu, S. [Comparative analysis of 6 kinds of bacteria in the subgingival plaque in different types of patients with periodontal diseases]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue Shanghai J. Stomatol.* **24**, 574–578 (2015).
508. Madianos, P. N., Bobetsis, Y. A. & Kinane, D. F. Generation of inflammatory stimuli: how bacteria set up inflammatory responses in the gingiva. *J. Clin. Periodontol.* **32 Suppl 6**, 57–71 (2005).
509. Mäntylä, P. *et al.* Monitoring periodontal disease status in smokers and nonsmokers using a gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-8-specific chair-side test. *J. Periodontol. Res.* **41**, 503–512 (2006).
510. Gursoy, U. K. *et al.* Salivary MMP-8, TIMP-1, and ICTP as markers of advanced periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **37**, 487–493 (2010).
511. Leppilähti, J. M. *et al.* Oral rinse MMP-8 point-of-care immuno test identifies patients with strong periodontal inflammatory burden. *Oral Dis.* **17**, 115–122 (2011).
512. Miao, D., Fenno, J. C., Timm, J. C., Joo, N. E. & Kapila, Y. L. The Treponema denticola chymotrypsin-like protease dentilisin induces matrix metalloproteinase-2-dependent fibronectin fragmentation in periodontal ligament cells. *Infect. Immun.* **79**, 806–811 (2011).

513. Tribble, G. D., Mao, S., James, C. E. & Lamont, R. J. A Porphyromonas gingivalis haloacid dehalogenase family phosphatase interacts with human phosphoproteins and is important for invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 11027–11032 (2006).
514. Andrian, E., Grenier, D. & Rouabhia, M. Porphyromonas gingivalis-epithelial cell interactions in periodontitis. *J. Dent. Res.* **85**, 392–403 (2006).
515. Loos, B. G. Systemic markers of inflammation in periodontitis. *J. Periodontol.* **76**, 2106–2115 (2005).
516. Barksby, H. E., Lea, S. R., Preshaw, P. M. & Taylor, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 217–225 (2007).
517. Kawai, T. *et al.* B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am. J. Pathol.* **169**, 987–998 (2006).
518. Axelsson, P., Albandar, J. M. & Rams, T. E. Prevention and control of periodontal diseases in developing and industrialized nations. *Periodontol. 2000* **29**, 235–246 (2002).
519. Darveau, R. P. The oral microbial consortium's interaction with the periodontal innate defense system. *DNA Cell Biol.* **28**, 389–395 (2009).
520. Tonetti, M. S., Imboden, M. A. & Lang, N. P. Neutrophil migration into the gingival sulcus is associated with transepithelial gradients of interleukin-8 and ICAM-1. *J. Periodontol.* **69**, 1139–1147 (1998).
521. Ren, L., Leung, W. K., Darveau, R. P. & Jin, L. The expression profile of lipopolysaccharide-binding protein, membrane-bound CD14, and toll-like receptors 2 and 4 in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **76**, 1950–1959 (2005).
522. F.WOLF, E.M. RATEITSCHAK & K.H. RATEITSCHAK. Parodontologie. *ELSEVIER / MASSON* (2005).
523. Lappin, D. F., Koulouri, O., Radvar, M., Hodge, P. & Kinane, D. F. Relative proportions of mononuclear cell types in periodontal lesions analyzed by immunohistochemistry. *J. Clin. Periodontol.* **26**, 183–189 (1999).
524. Thorbert-Mros, S., Larsson, L. & Berglundh, T. Cellular composition of long-standing gingivitis and periodontitis lesions. *J. Periodontol. Res.* **50**, 535–543 (2015).
525. Mahanonda, R. *et al.* Human Memory B Cells in Healthy Gingiva, Gingivitis, and Periodontitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 715–725 (2016).
526. Berglundh, T. & Donati, M. Aspects of adaptive host response in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **32 Suppl 6**, 87–107 (2005).
527. Gemmell, E., Carter, C. L., Hart, D. N. J., Drysdale, K. E. & Seymour, G. J. Antigen-presenting cells in human periodontal disease tissues. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 388–393 (2002).
528. Okada, H., Kida, T. & Yamagami, H. Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.* **41**, 365–374 (1983).
529. Jotwani, R. *et al.* Mature dendritic cells infiltrate the T cell-rich region of oral mucosa in chronic periodontitis: in situ, in vivo, and in vitro studies. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **167**, 4693–4700 (2001).
530. Nakajima, T. *et al.* CXCL13 expression and follicular dendritic cells in relation to B-cell infiltration in periodontal disease tissues. *J. Periodontol. Res.* **43**, 635–641 (2008).
531. Orima, K., Yamazaki, K., Aoyagi, T. & Hara, K. Differential expression of costimulatory molecules in chronic inflammatory periodontal disease tissue. *Clin. Exp. Immunol.* **115**, 153–160 (1999).
532. Mahanonda, R. *et al.* Upregulation of co-stimulatory molecule expression and dendritic cell marker (CD83) on B cells in periodontal disease. *J. Periodontol. Res.* **37**, 177–183 (2002).
533. Jotwani, R. & Cutler, C. W. Multiple dendritic cell (DC) subpopulations in human gingiva and association of mature DCs with CD4+ T-cells in situ. *J. Dent. Res.* **82**, 736–741 (2003).
534. Zouali, M. The emerging roles of B cells as partners and targets in periodontitis. *Autoimmunity* **50**, 61–70 (2017).
535. Han, X. *et al.* Expression of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand by B cells in response to oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 190–196 (2009).
536. Abe, T. *et al.* The B Cell-Stimulatory Cytokines BLYS and APRIL Are Elevated in Human Periodontitis and Are Required for B Cell-Dependent Bone Loss in Experimental Murine Periodontitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **195**, 1427–1435 (2015).
537. Malcolm, J. *et al.* IL-33 Exacerbates Periodontal Disease through Induction of RANKL. *J. Dent. Res.* **94**, 968–975 (2015).

538. Oliver-Bell, J. *et al.* Periodontitis in the absence of B cells and specific anti-bacterial antibody. *Mol. Oral Microbiol.* **30**, 160–169 (2015).
539. Coat, J. *et al.* Anti-B lymphocyte immunotherapy is associated with improvement of periodontal status in subjects with rheumatoid arthritis. *J. Clin. Periodontol.* **42**, 817–823 (2015).
540. Kanzaki, H. *et al.* Soluble RANKL Cleaved from Activated Lymphocytes by TNF- $\alpha$ -Converting Enzyme Contributes to Osteoclastogenesis in Periodontitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **197**, 3871–3883 (2016).
541. Pers, J.-O. *et al.* Is periodontal disease mediated by salivary BAFF in Sjögren's syndrome? *Arthritis Rheum.* **52**, 2411–2414 (2005).
542. Ogawa, T. *et al.* Analysis of human IgG and IgA subclass antibody-secreting cells from localized chronic inflammatory tissue. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **142**, 1150–1158 (1989).
543. Takahashi, K., Mooney, J., Frandsen, E. V. & Kinane, D. F. IgG and IgA subclass mRNA-bearing plasma cells in periodontitis gingival tissue and immunoglobulin levels in the gingival crevicular fluid. *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 158–165 (1997).
544. Mizutani, Y. *et al.* In situ visualization of plasma cells producing antibodies reactive to Porphyromonas gingivalis in periodontitis: the application of the enzyme-labeled antigen method. *Mol. Oral Microbiol.* **29**, 156–173 (2014).
545. Lopatin, D. E. & Blackburn, E. Avidity and titer of immunoglobulin G subclasses to Porphyromonas gingivalis in adult periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**, 332–337 (1992).
546. Takeuchi, Y. *et al.* Immunoglobulin G subclass antibody profiles in Porphyromonas gingivalis-associated aggressive and chronic periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* **21**, 314–318 (2006).
547. Lappin, D. F. *et al.* Influence of periodontal disease, Porphyromonas gingivalis and cigarette smoking on systemic anti-citrullinated peptide antibody titres. *J. Clin. Periodontol.* **40**, 907–915 (2013).
548. Cutler, C. W., Kalmar, J. R. & Arnold, R. R. Phagocytosis of virulent Porphyromonas gingivalis by human polymorphonuclear leukocytes requires specific immunoglobulin G. *Infect. Immun.* **59**, 2097–2104 (1991).
549. Vincents, B. *et al.* Cleavage of IgG1 and IgG3 by gingipain K from Porphyromonas gingivalis may compromise host defense in progressive periodontitis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **25**, 3741–3750 (2011).
550. De-Gennaro, L. A., Lopes, J. D. & Mariano, M. Autoantibodies directed to extracellular matrix components in patients with different clinical forms of periodontitis. *J. Periodontol.* **77**, 2025–2030 (2006).
551. Koutouzis, T., Haber, D., Shaddox, L., Aukhil, I. & Wallet, S. M. Autoreactivity of serum immunoglobulin to periodontal tissue components: a pilot study. *J. Periodontol.* **80**, 625–633 (2009).
552. Harvey, G. P. *et al.* Expression of peptidylarginine deiminase-2 and -4, citrullinated proteins and anti-citrullinated protein antibodies in human gingiva. *J. Periodontal Res.* **48**, 252–261 (2013).
553. de Pablo, P. *et al.* The autoantibody repertoire in periodontitis: a role in the induction of autoimmunity to citrullinated proteins in rheumatoid arthritis? *Ann. Rheum. Dis.* **73**, 580–586 (2014).
554. Rothstein, T. L., Griffin, D. O., Holodick, N. E., Quach, T. D. & Kaku, H. Human B-1 cells take the stage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1285**, 97–114 (2013).
555. Berglundh, T., Donati, M. & Zitzmann, N. B cells in periodontitis: friends or enemies? *Periodontol. 2000* **45**, 51–66 (2007).
556. Donati, M., Liljenberg, B., Zitzmann, N. U. & Berglundh, T. B-1a cells and plasma cells in periodontitis lesions. *J. Periodontal Res.* **44**, 683–688 (2009).
557. Slots, J., Saygun, I., Sabeti, M. & Kubar, A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J. Periodontal Res.* **41**, 235–244 (2006).
558. Demoersman, J. *et al.* B cell subset distribution is altered in patients with severe periodontitis. *PloS One* **13**, e0192986 (2018).
559. Page, R. C. & Kornman, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol. 2000* **14**, 9–11 (1997).
560. Kornman, K. S. Mapping the pathogenesis of periodontitis: a new look. *J. Periodontol.* **79**, 1560–1568 (2008).
561. Lowe, A.-M., Yansouni, C. P. & Behr, M. A. Causality and gastrointestinal infections: Koch, Hill, and Crohn's. *Lancet Infect. Dis.* **8**, 720–726 (2008).

562. Riep, B. *et al.* Are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1705–1711 (2009).
563. Kumar, P. S. *et al.* Changes in periodontal health status are associated with bacterial community shifts as assessed by quantitative 16S cloning and sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 3665–3673 (2006).
564. Umeda, M. *et al.* Risk indicators for harboring periodontal pathogens. *J. Periodontol.* **69**, 1111–1118 (1998).
565. Mombelli, A. & Meier, C. On the symmetry of periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **28**, 741–745 (2001).
566. Slots, J. Human viruses in periodontitis. *Periodontol.* **2000** **53**, 89–110 (2010).
567. Berezow, A. B. & Darveau, R. P. Microbial shift and periodontitis. *Periodontol.* **2000** **55**, 36–47 (2011).
568. Manji, F., Dahlen, G. & Fejerskov, O. Caries and Periodontitis: Contesting the Conventional Wisdom on Their Aetiology. *Caries Res.* **52**, 548–564 (2018).
569. Slots, J. Herpesviruses in periodontal diseases. *Periodontol.* **2000** **38**, 33–62 (2005).
570. Slots, J. Herpesviral-bacterial interactions in periodontal diseases. *Periodontol.* **2000** **52**, 117–140 (2010).
571. Slots, J. Periodontal herpesviruses: prevalence, pathogenicity, systemic risk. *Periodontol.* **2000** **69**, 28–45 (2015).
572. Contreras, A., Nowzari, H. & Slots, J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**, 15–18 (2000).
573. Kubar, A., Saygun, I., Ozdemir, A., Yapar, M. & Slots, J. Real-time polymerase chain reaction quantification of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in periodontal pockets and the adjacent gingiva of periodontitis lesions. *J. Periodontol. Res.* **40**, 97–104 (2005).
574. Moghim, S. H., Chalabi, M., Abed, A. M., Rezaei, F. & Tamizifar, H. Prevalence of Epstein-Barr virus type 1 in patients with chronic periodontitis by nested-PCR. *Pak. J. Biol. Sci. PJBS* **10**, 4547–4550 (2007).
575. Rotola, A. *et al.* Human herpesvirus 7, Epstein-Barr virus and human cytomegalovirus in periodontal tissues of periodontally diseased and healthy subjects. *J. Clin. Periodontol.* **35**, 831–837 (2008).
576. Imbrunito, A. V., Okuda, O. S., Maria de Freitas, N., Moreira Lotufo, R. F. & Nunes, F. D. Detection of herpesviruses and periodontal pathogens in subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, generalized aggressive periodontitis, or gingivitis. *J. Periodontol.* **79**, 2313–2321 (2008).
577. Wu, Y., Yan, J., Chen, L., Sun, W. & Gu, Z. Infection frequency of Epstein-Barr virus in subgingival samples from patients with different periodontal status and its correlation with clinical parameters. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* **7**, 876–883 (2006).
578. Saygun, I., Kubar, A., Sahin, S., Sener, K. & Slots, J. Quantitative analysis of association between herpesviruses and bacterial pathogens in periodontitis. *J. Periodontol. Res.* **43**, 352–359 (2008).
579. Chalabi, M. *et al.* Periodontopathic bacteria and herpesviruses in chronic periodontitis. *Mol. Oral Microbiol.* **25**, 236–240 (2010).
580. Bilichodmath, S. *et al.* Herpesviruses in chronic and aggressive periodontitis patients in an Indian population. *J. Oral Sci.* **51**, 79–86 (2009).
581. Sahin, S., Saygun, I., Kubar, A. & Slots, J. Periodontitis lesions are the main source of salivary cytomegalovirus. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 340–342 (2009).
582. Zhu, C. *et al.* Association between Herpesviruses and Chronic Periodontitis: A Meta-Analysis Based on Case-Control Studies. *PLoS One* **10**, e0144319 (2015).
583. Grenier, G., Gagnon, G. & Grenier, D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol. Immunol.* **24**, 506–509 (2009).
584. Kazi, M. M. A. G. & Bharadwaj, R. Role of herpesviruses in chronic periodontitis and their association with clinical parameters and in increasing severity of the disease. *Eur. J. Dent.* **11**, 299–304 (2017).
585. Shah, R. & Mehta, D. S. Prevalence of herpesviruses in gingivitis and chronic periodontitis: relationship to clinical parameters and effect of treatment. *J. Indian Soc. Periodontol.* **20**, 279–285 (2016).
586. Idesawa, M. *et al.* Detection of Epstein-Barr virus in saliva by real-time PCR. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 230–232 (2004).
587. Dang, V. D., Hilgenberg, E., Ries, S., Shen, P. & Fillatreau, S. From the regulatory functions of B cells to the identification of cytokine-producing plasma cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **28**, 77–83 (2014).
588. Fillatreau, S. Regulatory plasma cells. *Curr. Opin. Pharmacol.* **23**, 1–5 (2015).

589. Mogensen, T. H. & Paludan, S. R. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **65**, 131–150 (2001).
590. Gemmell, E., Yamazaki, K. & Seymour, G. J. The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity. *Periodontol. 2000* **43**, 14–40 (2007).
591. Hai, R. *et al.* Infection of human cytomegalovirus in cultured human gingival tissue. *Virology* **3**, 84 (2006).
592. Nogueira, P. A., Carneiro, S. & Ramos-e-Silva, M. Oral lichen planus: an update on its pathogenesis. *Int. J. Dermatol.* **54**, 1005–1010 (2015).
593. Aghbari, S. M. H. *et al.* Malignant transformation of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A meta-analysis of 20095 patient data. *Oral Oncol.* **68**, 92–102 (2017).
594. Carbone, M. *et al.* Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis.* **15**, 235–243 (2009).
595. Santoro, A. *et al.* Cytotoxic molecule expression and epithelial cell apoptosis in oral and cutaneous lichen planus. *Am. J. Clin. Pathol.* **121**, 758–764 (2004).
596. Das, S., Krithiga, G. S. P. & Gopalakrishnan, S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *J. Oral Maxillofac. Pathol. JOMFP* **16**, 203–209 (2012).
597. Kato, A., Imai, K., Ochiai, K. & Ogata, Y. Higher prevalence of Epstein-Barr virus DNA in deeper periodontal pockets of chronic periodontitis in Japanese patients. *PLoS One* **8**, e71990 (2013).
598. Graves, D. T., Oates, T. & Garlet, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J. Oral Microbiol.* **3**, (2011).
599. Shimono, M. *et al.* Biological characteristics of the junctional epithelium. *J. Electron Microsc. (Tokyo)* **52**, 627–639 (2003).
600. Hatakeyama, S. *et al.* Expression pattern of adhesion molecules in junctional epithelium differs from that in other gingival epithelia. *J. Periodontal Res.* **41**, 322–328 (2006).
601. Carcuac, O. & Berglundh, T. Composition of Human Peri-implantitis and Periodontitis Lesions. *J. Dent. Res.* **93**, 1083–1088 (2014).
602. Frigyesi, I. *et al.* Robust isolation of malignant plasma cells in multiple myeloma. *Blood* **123**, 1336–1340 (2014).
603. Lin, P., Owens, R., Tricot, G. & Wilson, C. S. Flow cytometric immunophenotypic analysis of 306 cases of multiple myeloma. *Am. J. Clin. Pathol.* **121**, 482–488 (2004).
604. Reid, S. *et al.* Characterisation and relevance of CD138-negative plasma cells in plasma cell myeloma. *Int. J. Lab. Hematol.* **32**, e190-196 (2010).
605. Grigoriadis, G. & Whitehead, S. CD138 shedding in plasma cell myeloma. *Br. J. Haematol.* **150**, 249 (2010).
606. Kumar, S., Kimlinger, T. & Morice, W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma cell disorders. *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* **23**, 433–451 (2010).
607. Kimura, H. *et al.* Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J. Infect. Dis.* **200**, 1078–1087 (2009).
608. Ito, Y. *et al.* Identification of Epstein-Barr virus-infected CD27+ memory B-cells in liver or stem cell transplant patients. *J. Gen. Virol.* **92**, 2590–2595 (2011).
609. Kawabe, S. *et al.* Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Sci.* **103**, 1481–1488 (2012).
610. Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, C. C. & Thorley-Lawson, D. A. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* **5**, e1000496 (2009).
611. Huynh, G. T. & Rong, L. Modeling the dynamics of virus shedding into the saliva of Epstein-Barr virus positive individuals. *J. Theor. Biol.* **310**, 105–114 (2012).
612. Ascherio, A. & Munger, K. L. Epidemiology of Multiple Sclerosis: From Risk Factors to Prevention-An Update. *Semin. Neurol.* **36**, 103–114 (2016).
613. Wu, T. C. & Kuo, T. T. Study of Epstein-Barr virus early RNA 1 (EBER1) expression by in situ hybridization in thymic epithelial tumors of Chinese patients in Taiwan. *Hum. Pathol.* **24**, 235–238 (1993).

614. Wu, T. C. *et al.* Abundant expression of EBER1 small nuclear RNA in nasopharyngeal carcinoma. A morphologically distinctive target for detection of Epstein-Barr virus in formalin-fixed paraffin-embedded carcinoma specimens. *Am. J. Pathol.* **138**, 1461–1469 (1991).
615. Fanaian, N. K., Cohen, C., Waldrop, S., Wang, J. & Shehata, B. M. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA: automated in-situ hybridization (ISH) compared with manual ISH and immunohistochemistry for detection of EBV in pediatric lymphoproliferative disorders. *Pediatr. Dev. Pathol. Off. J. Soc. Pediatr. Pathol. Paediatr. Pathol. Soc.* **12**, 195–199 (2009).
616. Yu, F., Lu, Y., Petersson, F., Wang, D.-Y. & Loh, K. S. Presence of lytic Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* **40**, 1515–1523 (2018).
617. Pelletier, N. *et al.* The endoplasmic reticulum is a key component of the plasma cell death pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **176**, 1340–1347 (2006).
618. Magliozzi, R. *et al.* B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 29–41 (2013).
619. Chan, O. T., Madaio, M. P. & Shlomchik, M. J. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol. Rev.* **169**, 107–121 (1999).
620. Edwards, J. C. W. *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2572–2581 (2004).
621. Antel, J. & Bar-Or, A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J. Neuroimmunol.* **180**, 3–8 (2006).
622. Liossis, S.-N. C. & Sfikakis, P. P. Rituximab-induced B cell depletion in autoimmune diseases: potential effects on T cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **127**, 280–285 (2008).
623. Minamitani, T. *et al.* Evasion of affinity-based selection in germinal centers by Epstein-Barr virus LMP2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11612–11617 (2015).
624. Lundström, I. M. Serum immunoglobulins and autoantibodies in patients with oral lichen planus. *Int. J. Oral Surg.* **14**, 259–268 (1985).
625. Chang, J. Y.-F., Chiang, C.-P., Hsiao, C. K. & Sun, A. Significantly higher frequencies of presence of serum autoantibodies in Chinese patients with oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **38**, 48–54 (2009).
626. Gholizadeh, N., Khoini Poorfar, H., TaghaviZenouz, A., Vatandoost, M. & Mehdipour, M. Comparison of Serum Autoantibodies to Desmogleins I, III in Patients with Oral Lichen Planus and Healthy Controls. *Iran. J. Pathol.* **10**, 136–140 (2015).
627. Vahide, L., Zahra, H., Forugh, G. & Nazi, S. Autoantibodies to desmogleins 1 and 3 in patients with lichen planus. *Arch. Dermatol. Res.* **309**, 579–583 (2017).
628. Chiang, C.-P. *et al.* Oral lichen planus - Differential diagnoses, serum autoantibodies, hematinic deficiencies, and management. *J. Formos. Med. Assoc. Taiwan Yi Zhi* **117**, 756–765 (2018).
629. Rosser, E. C. & Mauri, C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* **42**, 607–612 (2015).
630. Carter, N. A., Rosser, E. C. & Mauri, C. Interleukin-10 produced by B cells is crucial for the suppression of Th17/Th1 responses, induction of T regulatory type 1 cells and reduction of collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **14**, R32 (2012).
631. Kinnunen, T. *et al.* Accumulation of peripheral autoreactive B cells in the absence of functional human regulatory T cells. *Blood* **121**, 1595–1603 (2013).
632. Carter, N. A. *et al.* Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 5569–5579 (2011).
633. Yamamoto, T. & Osaki, T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J. Invest. Dermatol.* **104**, 784–788 (1995).
634. Unver, N. & McAllister, F. IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* **41**, 10–17 (2018).
635. Fayyazi, A. *et al.* T lymphocytes and altered keratinocytes express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch. Dermatol. Res.* **291**, 485–490 (1999).

636. Dinarello, C. A. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol. Rev.* **281**, 8–27 (2018).
637. Takeuchi, Y., Tohnai, I., Kaneda, T. & Nagura, H. Immunohistochemical analysis of cells in mucosal lesions of oral lichen planus. *J. Oral Pathol.* **17**, 367–373 (1988).
638. Ge, Y. *et al.* The molecular mechanisms of the effect of Dexamethasone and Cyclosporin A on TLR4 /NF- $\kappa$ B signaling pathway activation in oral lichen planus. *Gene* **508**, 157–164 (2012).
639. Yamamoto, T., Osaki, T., Yoneda, K. & Ueta, E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **23**, 309–315 (1994).
640. Russo, R. C., Garcia, C. C., Teixeira, M. M. & Amaral, F. A. The CXCL8/IL-8 chemokine family and its receptors in inflammatory diseases. *Expert Rev. Clin. Immunol.* **10**, 593–619 (2014).
641. Rhodus, N. L. *et al.* A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* **114**, 278–283 (2005).
642. Rhodus, N. L. *et al.* Proinflammatory cytokine levels in saliva before and after treatment of (erosive) oral lichen planus with dexamethasone. *Oral Dis.* **12**, 112–116 (2006).
643. Sun, A., Wang, J. T., Chia, J. S. & Chiang, C. P. Serum interleukin-8 level is a more sensitive marker than serum interleukin-6 level in monitoring the disease activity of oral lichen planus. *Br. J. Dermatol.* **152**, 1187–1192 (2005).
644. Zhang, Y. *et al.* NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Cytokine* **41**, 144–149 (2008).
645. Lu, R., Zhang, J., Sun, W., Du, G. & Zhou, G. Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: an overview. *J. Oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **44**, 1–14 (2015).
646. Kim, Y. C. *et al.* Presence of Porphyromonas gingivalis and plasma cell dominance in gingival tissues with periodontitis. *Oral Dis.* **16**, 375–381 (2010).
647. Baker, P. J., Boutaugh, N. R., Tiffany, M. & Roopenian, D. C. B Cell IgD Deletion Prevents Alveolar Bone Loss Following Murine Oral Infection. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2009**, 864359 (2009).
648. Vadasz, Z., Haj, T., Kessel, A. & Toubi, E. B-regulatory cells in autoimmunity and immune mediated inflammation. *FEBS Lett.* **587**, 2074–2078 (2013).
649. Hanookai, D., Nowzari, H., Contreras, A., Morrison, J. L. & Slots, J. Herpesviruses and periodontopathic bacteria in Trisomy 21 periodontitis. *J. Periodontol.* **71**, 376–384 (2000).
650. Sunde, P. T., Olsen, I., Enersen, M. & Grinde, B. Patient with severe periodontitis and subgingival Epstein-Barr virus treated with antiviral therapy. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **42**, 176–178 (2008).
651. Fu, Y., Li, X., Gong, Y. & Xu, H. [Valacyclovir as an adjunct to full-mouth scaling and root planing of advanced chronic periodontitis:a randomized clinical trail]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue Shanghai J. Stomatol.* **23**, 103–106 (2014).