



HAL
open science

Immunopathologie de la Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8. Altérations des Cellules iNKT et Lymphocytes B

Zineb Sbihi

► **To cite this version:**

Zineb Sbihi. Immunopathologie de la Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8. Altérations des Cellules iNKT et Lymphocytes B. Immunologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2017. Français. NNT : 2017PA066221 . tel-02298576

HAL Id: tel-02298576

<https://theses.hal.science/tel-02298576>

Submitted on 27 Sep 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.

Université Pierre et Marie Curie

Physiologie, physiopathologie et thérapeutique – ED 394

Centre d'Immunologie et de Maladies Infectieuses / Immunité et immunogénétique antivirale
et vaccinale

Immunopathologie de la Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8

Altérations des Cellules iNKT et Lymphocytes B

Par Zineb SBIHI

Thèse de doctorat d'Immunologie

Dirigée par le Pr. Guislaine CARCELAIN

Présentée et soutenue publiquement le 25/09/2017

Devant un jury composé de :

Président : Monsieur le Professeur Hans YSSEL

Rapporteur : Monsieur le Professeur Sylvain LATOUR

Rapporteur : Monsieur le Professeur Bertrand HUARD

Examineur : Madame le Docteur Delphine SAUCE

Examineur : Madame le Professeur Laurence WEISS

Directeur de thèse : Madame le Professeur Guislaine CARCELAIN



Except where otherwise noted, this work is licensed under
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>

Dédicace

A mon époux

« Celui à qui l'amour a donné la vie ne mourra jamais. C'est pourquoi l'éternité de notre existence est inscrite sur les feuillets de l'univers. »

Chams al-Din Muhammad Hafiz

Remerciements

Je tiens à remercier le **Pr. Hans Yssel** qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Je remercie également le **Pr. Sylvain Latour** et le **Pr. Bertrand Huard** pour avoir accepté d'évaluer mon travail et pour l'attention qu'ils ont su y porter.

Merci également au **Dr. Delphine Sauce** et au **Pr. Laurence Weiss** qui ont bien voulu examiner ce travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement ma directrice de thèse, le **Pr. Guislaine Carcelain** pour son encadrement, son enseignement, son soutien, sa patience et ses conseils avisés pendant ces cinq années passées à ses côtés.

Bien au-delà de son rôle d'encadrante, Guislaine a été pour moi un véritable guide à la fois dans l'univers professionnel qui est désormais le mien, et très souvent aussi, sur les autres aspects de la vie en général.

Je remercie le **Pr. Brigitte Autran** pour sa bienveillance et pour m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci à **Antoine Dossier** qui avait initié le projet et qui m'a transmis les outils nécessaires pour poser les bases de ma thèse. Je le remercie également pour nos interactions et discussions scientifiques très enrichissantes.

Je remercie aussi vivement les membres de mon équipe : **Amandine Emarre, Mariama Dialo, Assia Samri, Chiraz Hamimi** et **Amélie Guihot**.

Merci à l'équipe NK : **Oliver Lucar, Nadine Tarantino, Batiste Hervier, Mely Popa** et le **Dr. Vincent Vieillard** pour m'avoir accueilli dans leur équipe et pour tous nos échanges scientifiques stimulants.

Merci à **Véronique Morin, Anne Oudin** et le **Dr. Rima Zoroob** pour votre aide précieuse et votre contribution à mes expériences de biologie moléculaire.

Un grand merci à mon ami **Oliver Lucar** qui a été là quotidiennement que ce soit pour une pause-café, une partie de cartes ou encore de chasse aux Pokémons, pour nos fou-rires... et également pour nos nombreux débats scientifiques, ses conseils et son écoute.

Merci à **Morgane Griesbeck** qui a été d'un grand soutien pendant ma thèse. Elle a toujours été à mon écoute et a toujours su employer les mots appropriés pour me remonter le moral lorsqu'il le fallait.

Merci également à l'ensemble des doctorants du CIMI : **Angeline, Delphine, Jessica, Pauline et Simon.**

Merci à mes amis : **Nancy, Giulia, Myriam, Adélie et Mikael** pour avoir rendu nos nombreuses années passées à Jussieu inoubliables. Nous nous étions donné rendez-vous dans 10 ans, il n'en reste plus que 3 pour se retrouver devant le CROUS de Jussieu, en espérant qu'il n'ait pas changé d'emplacement...

Merci à ma famille : **Maman, Papa et ma sœur**, pour leur amour et leur support. J'espère vous avoir rendu fiers de moi.

Merci enfin à **mon époux**, pour son soutien inconditionnel.

Sommaire

| | |
|--|----|
| Remerciements | 4 |
| Sommaire | 8 |
| Introduction | 10 |
| I. Herpès Humain Virus-8 (HHV-8) | 12 |
| A. Le virus HHV-8..... | 12 |
| 1. Phylogénie : un virus proche de l’EBV..... | 12 |
| 2. Structure et génome..... | 12 |
| 3. Le cycle viral..... | 13 |
| 4. Transmission, tropisme et récepteurs cellulaires..... | 14 |
| B. Pathologies tumorales associées à HHV-8 | 16 |
| 1. Le Sarcome de Kaposi..... | 16 |
| 2. Le Lymphome Primitif des Séreuses | 16 |
| 3. La Maladie de Castleman Multicentrique | 17 |
| C. Protéines impliquées dans la transformation cellulaire | 18 |
| 1. Protéines de latence | 18 |
| 2. Phase lytique de HHV-8 et protéines associées | 23 |
| II. Lymphocytes B et γ -Herpèsvirus..... | 30 |
| A. Les lymphocytes B | 30 |
| 1. La lymphopoïèse B..... | 30 |
| 2. Les sous-populations de B naïves | 32 |
| 3. Les réponses immunes B..... | 33 |
| 4. Les lymphocytes B mémoires | 39 |
| 5. La différenciation plasmocytaire | 39 |
| B. Les γ -Herpèsvirus altèrent la voie de différenciation des lymphocytes B | 42 |
| 1. Les lymphocytes B sous l’influence de l’infection par l’EBV..... | 42 |
| 2. Les lymphocytes B sous l’influence de l’infection par HHV-8 | 43 |
| C. Les γ -Herpèsvirus altèrent la prolifération des lymphocytes B..... | 48 |
| 1. Parallèle entre EBV et HHV-8 pour leurs rôles sur la prolifération des lymphocytes B | 48 |
| 2. La prolifération des lymphocytes B infectés est associée à l’expression de la protéine d’HHV-8 LANA | 49 |
| 3. HHV-8 induit une altération du métabolisme cellulaire | 50 |
| III. HHV-8 et le système immunitaire..... | 54 |
| A. Les réponses immunes mises en place contre HHV- 8 | 54 |
| 1. Induction des réponses immunes innées | 54 |
| 2. Réponses Natural Killer | 55 |
| 3. Réponses cellulaires T anti-HHV-8 | 55 |
| B. HHV-8 et échappement immunitaire..... | 59 |
| 1. La latence virale comme mécanisme d’échappement..... | 59 |
| 2. Échappement à la réponse immune innée | 60 |

| | |
|--|-----|
| 3. Échappement à la réponse immunitaire adaptative | 64 |
| IV. Les lymphocytes T Natural Killer invariants (iNKT)..... | 68 |
| A. Caractéristiques générales des cellules iNKT | 68 |
| 1. La molécule CD1d | 68 |
| 2. Développement, sélection thymique et maturation des cellules iNKT | 69 |
| 3. Distribution et localisation des cellules iNKT | 73 |
| 4. Caractéristiques fonctionnelles des cellules iNKT..... | 73 |
| B. Maintenance et homéostasie périphérique des cellules iNKT..... | 74 |
| 1. Homéostasie des cellules iNKT | 74 |
| 2. Coopération cellules iNKT et lymphocytes B..... | 75 |
| C. Activation des cellules iNKT | 76 |
| 1. Reconnaissance directe des lipides dérivés de pathogènes | 76 |
| 2. Reconnaissance indirecte des pathogènes dépourvus de lipides..... | 77 |
| D. Rôle des cellules iNKT dans les pathologies | 78 |
| 1. Rôle antiviral des cellules iNKT | 78 |
| 2. Rôle antitumoral des cellules iNKT | 81 |
| Objectifs de la thèse | 84 |
| Résultats | 88 |
| I. Altérations des cellules iNKT et des lymphocytes B mémoires dans la Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8 | 90 |
| II. Analyse du profil d'expression des gènes des lymphocytes B LANA ⁺ infectés par HHV-8 circulants détectés chez les patients MCM HHV-8+ | 118 |
| III. Analyse de la région variable de la chaîne lourde de l'IgM exprimée par les lymphocytes B LANA ⁺ infectés par HHV-8..... | 164 |
| Discussion et perspectives..... | 174 |
| Table des illustrations..... | 190 |
| Résumé..... | 192 |
| Bibliographie..... | 196 |

Introduction

I. Herpès Humain Virus-8 (HHV-8)

A. Le virus HHV-8

1. Phylogénie : un virus proche de l'EBV

La famille des herpesviridæ est constituée d'une centaine de virus à ADN double brin, dont 8 strictement humains qui sont classés dans 3 sous-groupes : les α -, β - et γ -herpèsvirus. Les α -herpèsvirus incluent les virus Herpès Simplex de type 1 (HSV-1) et de type 2 (HSV-2) ainsi que le virus de la Varicelle et du Zona (VZV). Les β -herpèsvirus incluent le Cytomégalovirus Humain (HCMV ou plus couramment CMV) et les Herpès virus Humains 6 et 7 (HHV-6 et HHV-7). Les γ -herpèsvirus, qui possèdent des capacités transformantes, incluent le virus Epstein Barr (EBV) agent pathogène de la mononucléose et de différentes pathologies malignes (Cesarman, 2011) et l'Herpès virus Humain 8 (HHV-8 ou Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus, KSHV) mais aussi le virus Herpès Simien Saimiri (HVS) et le virus Herpès Murin 68 (MHV-68). HHV-8 et HVS sont classés dans le genre des rhadinovirus et HHV-8 représente le seul rhadinovirus humain identifié à ce jour. HHV-8 fait également parti des membres des herpèsvirus lymphotropes dont le prototype est le virus d'Epstein-Barr (EBV).

2. Structure et génome

Le virus HHV-8 a été caractérisé en 1994 par Chang et al. (Chang et al., 1994). Il possède un génome ADN double brin de 165 kb à 170 kilobases (kb) (Renne et al., 1996) protégé d'une nucléocapside (core) et d'une capsidie icosaédrique d'environ 1200 angströms de diamètre. La particule virale finale, qui mesure entre 100 et 150 nm de diamètre, est recouverte d'une bicouche lipidique qui constitue son enveloppe (Figure 1).

Le génome est composé d'une séquence codante unique d'environ 140,5 kb flanquée de 30 à 45 séquences terminales répétées (TR) riches en bases GC et longues de 801 paires de base, placées en tandem. La séquence codante contient environ 90 cadres de lecture ouverts ou ORF (open reading frame) dont la dénomination repose sur l'homologie de séquence, de position et d'orientation avec celles du virus Herpès Saimiri (HSV). Soixante-six de ces ORF codent pour des gènes structurellement analogues à ceux des autres Herpèsvirus (Chang et al., 1994;

Russo et al., 1996). Les gènes retrouvés uniquement chez le virus HHV-8 (sans homologie de séquence avec HSV) sont désignés par le préfixe K, K1 à K15, selon leur localisation relative (de gauche à droite) sur le génome (Figure 2).

De plus, le virus HHV-8 code pour 14 gènes homologues de gènes cellulaires de l'hôte, annotés avec le préfixe (v-) (Neipel et al., 1997b). Ainsi, le génome de ce virus code pour des protéines virales impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (v-Cycline), dans l'inhibition du programme de mort cellulaire (v-FLIP et v-Bcl-2) ou encore dans la modulation de la réponse immunitaire (v-CCL 1 à 3, v-IRF 1 à 4) (Neipel et al., 1997b).

Enfin, de nombreux gènes sont exprimés par épissage alternatif, et plus récemment, un total de 12 micro-ARNs a été mis en évidence dans le génome du virus HHV-8. Tous les micro-ARNs du virus HHV-8 sont exprimés durant la phase de latence et l'expression de certains d'entre eux est augmentée pendant la phase lytique du virus (Cai et al., 2005).

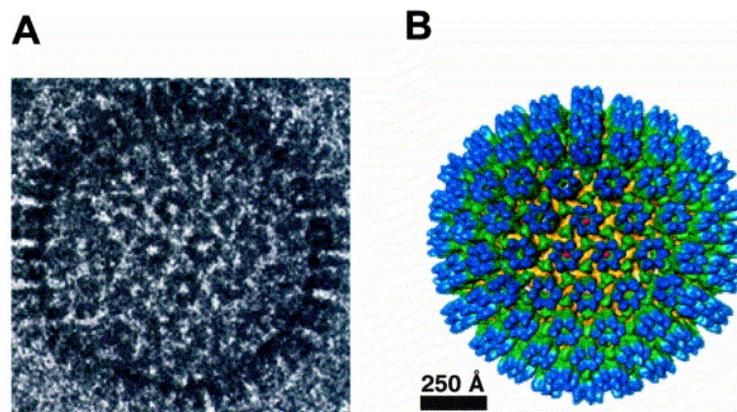


Figure 1. Structure 3 dimensions (3D) de la capsid du virus HHV-8. (A) Cryo-microscopie électronique de la capsid du virus HHV-8. (B) Reconstitution en 3D avec une résolution de 24 Å calculée à partir de 431 images. La capsid est icosaédrique formée de pentamères, d'hexamères (en bleu) et de triplex (en vert).

3. Le cycle viral

Comme les autres virus du groupe Herpès, HHV-8 possède 2 modes de réplication. Au cours du cycle latent, le virus persiste dans le noyau cellulaire sous forme d'ADN circulaire épisomal et échappe au système immunitaire grâce à l'expression restreinte de quelques gènes viraux. Aucune particules virales fonctionnelles ou infectieuses ne sont produites durant cette phase de latence. Le virus peut se réactiver pour rentrer dans un cycle de production lytique produisant de nouveaux virions et conduisant à la lyse de la cellule hôte. La phase lytique est caractérisée par la réplication linéaire du génome viral et par l'expression de plus de 80

transcrits dans un ordre bien précis de catégories de gènes : précoces immédiats (immediate-early, IE ou α), précoces (early, E ou β) et tardifs (late, L ou γ). Les gènes IE sont importants dans la régulation de la cascade transcriptionnelle des gènes viraux de cette phase de réplication lytique. En particulier, RTA (Replication and transcription activator, molécule transactivatrice de la phase lytique) est nécessaire et suffisant pour initier la réplication lytique (Lukac et al., 1999). En phase de latence, la protéine LANA bloque l'expression de RTA en se fixant sur son promoteur. La réactivation virale sera déclenchée par différents stimulus engendrant un déséquilibre du blocage par LANA du promoteur de RTA (Lan et al., 2005).

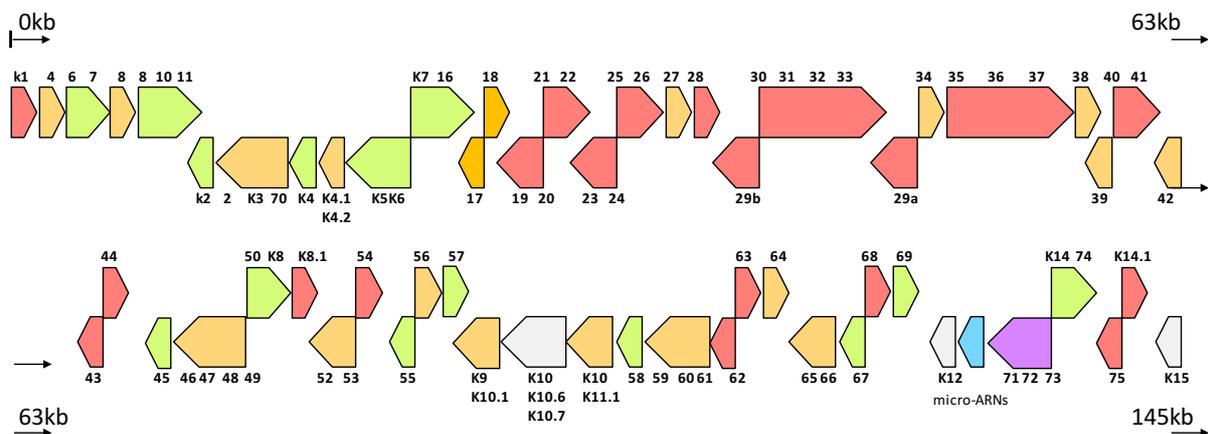


Figure 2. Illustration schématique du génome du virus HHV-8, montrant l'expression des gènes viraux. Adapté de Russo et al. 1996. Les flèches indiquent la direction de la transcription. Sont représentés en vert les gènes précoces immédiats, en orange les gènes précoces, en rouge les gènes tardifs. En blanc sont indiqués les gènes qui sont exprimés à la fois pendant les phases de latence et lytique. En violet sont indiqués les gènes exprimés au cours de la phase de latence du virus. La flèche bleue indique les positions des micro-ARNs. Les gènes uniquement exprimés par le virus HHV-8 sont désignés par le préfixe K, l'absence de celui-ci indique que c'est un ORF avec des homologies cellulaires ou avec un autre virus (Russo et al., 1996).

4. Transmission, tropisme et récepteurs cellulaires

L'Homme est l'hôte naturel du virus HHV-8. Chez des sujets immunocompétents, HHV-8 va établir une latence asymptomatique après la primo-infection, mais peut causer le développement de pathologies tumorales chez les sujets immunodéprimés. HHV-8 est principalement transmis par la salive (Cattani et al., 1999; de Franca et al., 2011) ou par contact sexuel (de Sanjose et al., 2009) mais il existe un risque de transmission par le sang ou les produits sanguins (Hladik et al., 2006) et par un don d'organe (Frances et al., 2009). Chez

les sujets immunocompétents, le virus HHV-8 peut établir une infection persistante asymptomatique.

Dans la population générale, la séroprévalence est très variable selon l'origine géographique. On observe une séroprévalence répartie selon un gradient nord / sud. Cette séroprévalence est faible (0 à 1%) dans les pays anglo-saxons, plus importante en Italie (7 à 33%). Elle est plus élevée (20 à 50%) en Afrique sub-saharienne, en Afrique de l'est, dans le pourtour méditerranéen, au Moyen Orient et en Amérique du sud. En France, 0,5 à 1% de la population sont séropositifs pour HHV-8, mais plus de 30% chez la population homosexuelle.

Ces données restent cependant complexes quant à leur interprétation du fait de la faible sensibilité des méthodes sérologiques et de la faible réplication du virus en situation normale (peu immunogénique).

In vivo, HHV-8 a été détecté au niveau des cellules endothéliales, des cellules épithéliales, des lymphocytes B et des monocytes (Ambroziak et al., 1995; Blasig et al., 1997; Dupin et al., 1999; Pauk et al., 2000). Plusieurs études suggèrent que les lymphocytes B et les monocytes constitueraient le réservoir de l'infection latente du virus. Cependant *in vitro*, HHV-8 peut infecter une plus large variété de cellules telles que les fibroblastes, les kératinocytes et les cellules plasmacytoïdes dendritiques (pDCs) (Akula et al., 2003; West et al., 2011). Toujours *in vitro*, l'infection primaire des lymphocytes B par HHV-8 n'entraîne pas une immortalisation de ces cellules et la réplication lytique est observée dans les lymphocytes B activés. Le virus possède donc un large tropisme cellulaire *in vivo* ou *in vitro*, mais les lymphocytes B sont les principales cibles pour l'établissement d'une latence virale à long terme (Ambroziak et al., 1995).

HHV-8 pénètre dans les lymphocytes B, les fibroblastes, les cellules épithéliales et endothéliales par endocytose (Akula et al., 2003; Inoue et al., 2003; Liao et al., 2003; Raghu et al., 2009; Rappocciolo et al., 2008). L'enveloppe du virus est composée de plusieurs glycoprotéines, gB (ORF8), gH (ORF22), gL (ORF47), gM (ORF39) et gN (ORF53) (Bechtel et al., 2005), également exprimées par les autres virus du groupe Herpès. La glycoprotéine gB est la glycoprotéine majeure de l'enveloppe du virus impliquée dans l'initiation de l'attachement et dans l'entrée de HHV-8 dans sa cellule cible. La glycoprotéine gB lie également la molécule DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3 Grabbing Non-integrin), exprimée par les lymphocytes B activés, constitutivement par les B de l'amygdale, par les cellules dendritiques et les macrophages, permettant ainsi l'entrée du virus (Rappocciolo et al., 2008; Rappocciolo et al., 2006). Toutefois, l'utilisation d'un anticorps anti-DC-SIGN ne bloque que partiellement l'infection par HHV-8 (Rappocciolo et

al., 2008; Rappocciolo et al., 2006), ce qui suggère que d'autres récepteurs interagissent probablement comme les Héparanes Sulfates (HS) et les intégrines $\alpha V\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$ (Akula et al., 2002; Garrigues et al., 2008; Wang et al., 2003).

B. Pathologies tumorales associées à HHV-8

HHV-8 est le dernier des membres de la famille des Herpèsvirus humains à être classifié en tant qu'oncogène direct par l'agence internationale de la recherche sur le cancer du fait de sa capacité à induire plusieurs pathologies tumorales. L'infection par HHV-8 est en effet impliquée dans le développement du sarcome de Kaposi (SK), du Lymphome Primitif des Séreuses (PEL) et de la Maladie de Castleman Multicentrique (MCM) (Cesarman et al., 1995; Chang et al., 1994; Gessain et al., 1996; Soulier et al., 1995)

1. Le Sarcome de Kaposi

Le Sarcome de Kaposi est une pathologie tumorale de tropisme principalement cutané dont la définition est histologique. Les lésions comprennent une prolifération tumorale endothéliale et fibroblastique, avec une néoangiogenèse, un œdème tissulaire, et une infiltration lymphoplasmocytaire modérée. Le virus HHV-8 est retrouvé dans 95% des cas dans les cellules fusiformes tumorales des lésions de SK, quelle que soit la forme clinique de la maladie (Dupin et al., 1999). Les gènes de latence sont majoritairement exprimés dans les lésions de SK alors que les gènes lytiques le sont faiblement (<1 à 5%). Il existe quatre formes cliniques de SK: le SK classique qui est une tumeur cutanée rare, indolente et localisée, touchant les extrémités, chez des personnes âgées, en majorité des hommes, dans le pourtour du bassin méditerranéen; le SK endémique de l'enfant et l'adulte jeune en Afrique de l'Est qui est une maladie sévère parfois disséminée; le SK post-transplantation décrite chez des greffés d'organes (rein, cœur, foie) traités par immunosuppresseurs; le SK associée au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) qui est aujourd'hui la forme la plus fréquente et un des cancers les plus fréquents de l'Afrique centrale et du Sud.

2. Le Lymphome Primitif des Séreuses

Le lymphome primitif des séreuses ou lymphome des cavités appartient au groupe des lymphomes non hodgkiniens de haut grade (agressif avec un mauvais pronostic) et survient principalement chez les patients immunodéprimés, tels que les patients infectés par le VIH. Il

se caractérise par une effusion de liquide lymphatique dans la plèvre, le péritoine ou le péricarde, sans masse tumorale solide associée. Les analyses histologiques montrent que les cellules malignes du PEL sont plus larges que les lymphocytes et les érythrocytes normaux, et présentent des caractéristiques à la fois de lymphome immunoblastique et de lymphome à large cellules anaplastiques (Carbone et al., 2009). Les cellules malignes du PEL sont clonales à en juger par les études de réarrangement des gènes des immunoglobulines et sont définies comme étant à un stade post-germinatif, pré-plasmocytaire de la différenciation lymphocytaire B (Gaidano et al., 1999a; Jenner et al., 2003). Trente à 70 % des patients avec un PEL ont également un SK et un diagnostic antérieur de SK est un facteur de risque pour le PEL (Eltom et al., 2002). HHV- 8 est toujours présent dans les cellules malignes de PEL, où l'on retrouve son génome en de multiples copies, de l'ordre de 50 à 100 copies par cellule (Renne et al., 1996). Le profil d'expression du virus HHV-8 dans les cellules de PEL est proche de celui du SK, les gènes principalement exprimés étant ceux de la latence (Jenner et al., 2001). Enfin, dans 60 à 95 % des cas de PEL les cellules tumorales sont co-infectées par l'EBV (Cesarman and Knowles, 1999).

3. La Maladie de Castleman Multicentrique

La Maladie de Castleman est une maladie lymphoproliférative B rare se présentant sous deux formes cliniques : la Maladie de Castleman Localisée et la Maladie de Castleman Multicentrique. La MCM ressemble à un lymphome avec des ganglions et une splénomégalie qui évolue par poussées se résolvant spontanément mais qui rechutent toujours.

Décrite pour la première fois par Castleman et Town en 1954 (Castleman and Towne, 1954), elle a émergé avec la pandémie du VIH. Son traitement repose sur l'utilisation de chimiothérapies et son pronostic est amélioré par l'utilisation du Rituximab (anti-CD20) bien que l'évolution reste fatale dans un grand nombre de cas. De nombreuses évidences supportent la responsabilité de HHV-8 dans l'apparition de la MCM. Soulier a montré dans une série de 35 patients présentant une MCM que le virus HHV-8 pouvait être détecté par PCR dans 100% des biopsies ganglionnaires des patients infectés par le VIH et dans 50% de celles des patients non infectés par le VIH (Soulier et al., 1995). Les cellules infectées sont toutes positives pour la protéine de latence LANA du virus HHV-8 et ne sont jamais co-infectées par le virus EBV.

Sur le plan physiopathologique, les poussées de MCM sont associées à deux caractéristiques majeures: une réplication du virus HHV-8 et une augmentation du taux d'interleukine- (IL-) 6

circulant suivant la réplication virale (Oksenhendler et al., 2000) (voir paragraphe B.2.b).

C. Protéines impliquées dans la transformation cellulaire

Après l'infection par HHV-8, les mécanismes physiopathologiques conduisant à la transformation tumorale des cellules infectées par HHV-8 impliquent de nombreuses protéines virales, latentes ou lytiques. Le potentiel transformant des gènes viraux a été mis en évidence dans des systèmes expérimentaux artificiels (expression isolée, dans des types cellulaires distincts des tumeurs dans lesquelles ils sont naturellement exprimés, sous le contrôle de promoteurs différents de leurs promoteurs natifs). Ces approches expérimentales ne permettent toutefois pas d'apprécier réellement l'activité oncogénique de ces gènes *in vivo*. À noter que l'infection expérimentale de cellules mononucléées sanguines par HHV-8 ne permet pas la transformation et que l'établissement de lignées lymphoblastoïdes infectées par HHV-8 n'est possible qu'en présence d'EBV.

De nombreuses protéines du virus HHV-8 participent également à l'échappement immunitaire, cet aspect sera traité au paragraphe III.2.

1. Protéines de latence

Comme les autres Herpèsvirus, HHV-8 est présent sous une forme latente dans la majorité des cellules qu'il infecte. Durant cette phase, le virus persiste dans le noyau cellulaire sous forme d'ADN circulaire épisomal (Renne et al., 1996). Seuls quelques gènes viraux sont nécessaires à ce mode de réplication (Zhong et al., 1996). Ces gènes interagissent avec le cycle cellulaire pour maintenir une infection latente et répliquer le génome viral pendant la mitose cellulaire. Dans cette forme latente peu de protéines virales sont produites, ce qui va considérablement limiter la présentation d'antigènes viraux par les cellules infectées aux lymphocytes T cytotoxiques (CTL). On dénombre 8 gènes codant pour des protéines exprimées constitutionnellement durant cette phase parfois inductible également en réplication lytique : ORF71/v-FLIP, ORF73/v-Cyclin, ORF73/LANA, K12/Kaposines, K10/v-IRF4/LANA-2, K11.1/v-IRF-2, K15 et K16. À noter que la protéine LANA est exprimée dans toutes les cellules infectées et de manière constitutive dans les 3 pathologies tumorales associées à HHV-8 que sont le SK, le PEL et la MCM (Dupin et al., 1999; Katano et al., 2000; Parravicini et al., 2000; Rainbow et al., 1997).

Au total, les protéines de latence vont agir de façon conjointe pour conduire à la pathogenèse de HHV- 8 en favorisant la latence, fournissant des conditions favorables à la croissance, et en empêchant l'apoptose des cellules infectées.

a) LANA

La protéine **LANA**, codée par le gène ORF73, est la protéine majeure de latence du virus. C'est un homologue fonctionnel de la protéine de latence EBNA-1 de l'EBV qui comme elle permet le maintien du virus dans la cellule infectée au cours de ses divisions successives. Ainsi, par le recrutement des composants de la machinerie cellulaire elle permet la **réplication des épisomes** au cours de la phase S et assure leur persistance par leur attachement aux chromosomes de la cellule hôte (Barbera et al., 2004; Barbera et al., 2006). LANA est la seule protéine virale indispensable au maintien des épisomes de HHV-8 dans les cellules infectées.

Cette protéine joue également un rôle important dans l'**immortalisation** des cellules infectées. Il a été montré que la protéine LANA augmente l'expression de la télomérase augmentant ainsi la durée de vie de la cellule infectée (Verma et al., 2004).

LANA possède également des propriétés **anti-apoptotique**. Elle est capable de s'associer au gène codant le facteur de transcription p53, réparateur de l'ADN cellulaire et pro-apoptotique en situation de dommage cellulaire, et d'inhiber son activité transcriptionnelle. Son expression protège les cellules de la lignée humaine d'ostéosarcome SaOS2 (déficiente en p53) de l'apoptose induite par la transfection du gène p53. De façon similaire, elle confère aux fibroblastes murins NIH-3T3 et aux cellules de la lignée de PEL BCBL1 une résistance à l'apoptose (p53-dépendante) provoquée par l'irradiation- γ (Friborg et al., 1999).

Par ailleurs, toujours dans des modèles *in vitro*, l'expression de LANA joue un rôle important dans l'induction de la **prolifération/transformation** de la cellule infectée. Elle stimule l'entrée en phase S en agissant sur la voie pRb/E2F. Cet effet s'exerce de façon directe par son interaction avec la protéine du rétinoblastome (pRb) qui réprime la transcription génique E2F-dépendante (Radkov et al., 2000). L'inhibition de pRB, induit la libération de E2F et initie la transcription de gènes impliqués dans la synthèse d'ADN tels que la DNA polymérase ou la thymidine kinase. Par ailleurs, par son interaction avec de multiples facteurs de transcription (dont Sp1, c-Jun et c-Myc), LANA se comporte comme un modulateur transcriptionnel, perturbant l'expression de nombreux gènes cellulaires (Bubman et al., 2007). De plus, LANA en coopération avec l'oncogène Hras est capable de transformer des cellules

embryonnaires primaires de rat dans un modèle de co-transfection, mais à elle seule, la protéine LANA est dépourvue de propriétés transformantes (Radkov et al., 2000).

In vivo, dans un modèle de souris transgéniques qui expriment de manière constitutive la protéine LANA dans les lymphocytes B, les souris ont une splénomégalie, une hyperplasie des follicules lymphoïdes et une expansion monoclonale des lymphocytes B matures. Chez ces animaux, la formation de centres germinatifs est accrue en l'absence de stimulation antigénique, et l'incidence des lymphomes s'en retrouve augmentée (Fakhari et al., 2006).

b) v-Cycline

La v-Cycline est une protéine de latence codée par le gène viral ORF72. Cette protéine partage des analogies de séquence (32%) et des homologies de fonction avec la Cycline D2 cellulaire. Son rôle est donc essentiellement d'induire la **prolifération** de la cellule infectée. Elle interagit avec la kinase cellulaire Cdk6 (Cyclin-dependent kinase 6) pour l'activer (Chang et al., 1996; Li et al., 1997) et permettre la dérégulation du cycle cellulaire. Ainsi, le complexe Cdk6-v-Cycline assure la phosphorylation et l'inactivation de différentes protéines telles que, la protéine du rétinoblastome pRB une protéine suppressive de tumeur impliquée dans l'inhibition de l'entrée de la cellule en phase S (voir ci-dessus), p27 qui est la protéine inhibitrice des Cdk-Cyclines dont l'expression provoque l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, et la protéine anti-apoptotique Bcl-2 (Ellis et al., 1999; Godden-Kent et al., 1997; Ojala et al., 2000).

De façon intéressante, les souris transgéniques pour v-Cycline, développent un lymphome dont les cellules sont déficientes en p53 (Verschuren et al., 2004). Le développement du lymphome observé chez ces souris s'explique par le fait que la v-Cycline peut aussi en bloquant Cdk9, arrêter la phosphorylation de p53 et donc lever l'arrêt du cycle cellulaire (Chang and Li, 2008).

c) v-FLIP

La protéine v-FLIP (viral FLICE inhibitory protein) ou K13 possède une homologie avec la caspase 8 et avec les protéines anti-apoptotiques cellulaires FLIP_S et FLIP_L. De fait, son expression a un effet **anti-apoptotique** dans la cellule infectée. Cet effet s'exerce de façon indirecte, par son interaction avec FADD qui empêche le récepteur de mort CD95 d'activer la caspase 8 (Thome et al., 1997), et de façon directe, en se liant à la caspase 8 (FLICE) empêchant son clivage et son activation (Belanger et al., 2001). De plus, elle active de façon

constitutive la voie de signalisation NF κ B, en interagissant avec les sous-unités régulatrices du complexe enzymatique IKK (les kinases IK α et IK β), avec RIP et avec le complexe NEMO (Liu et al., 2002; Matta et al., 2003) et augmente la survie cellulaire. L'inhibition de l'expression de v-FLIP par ARN interférence réduit fortement l'activité de NF κ B et provoque l'apoptose des lignées de PEL.

Des études *in vivo*, montrent que les souris transgéniques pour v-FLIP, ont une activation constitutive de NF κ B dans différents tissus lymphoïdes et peuvent développer un lymphome ou des tumeurs dérivées des lymphocytes B (Ahmad et al., 2010; Ballon et al., 2011; Chugh et al., 2005).

d) Kaposines

Les protéines Kaposines A, B et C, codées par le gène K12, sont exprimées dans la majorité des cellules fusiformes de Kaposi et possèdent des **propriétés transformantes**. La Kaposine B est directement impliquée dans la reprogrammation des cellules endothéliales infectées par HHV-8. Une étude montre que la Kaposine B empêche la dégradation de l'ARNm en activant directement la kinase MK2, cible de la voie de signalisation p38/MK2 impliquée dans la stabilisation des ARNm cellulaires (McCormick and Ganem, 2005, 2006). Plus récemment, Yoo et al ont montré dans le même modèle, que la Kaposine B permet en particulier la stabilisation de l'ARNm codant pour PROX1, une protéine régulatrice de la différenciation des cellules endothéliales. L'augmentation de l'expression de PROX1 induit une reprogrammation des cellules endothéliales vasculaires qui acquièrent environ 70% de l'identité moléculaire spécifique des cellules endothéliales du système lymphatique associé à une diminution de l'expression des gènes vasculaires (Yoo et al., 2010). Cette différenciation vers la lymphangiogénèse favoriserait la persistance virale.

De plus la Kaposine B stabilise les ARN contenant des AREs (AU-rich elements) et jouait donc un rôle dans la production de **cytokines pro-inflammatoires** (McCormick et Ganem 2005).

La Kaposine A induit l'activation de la voie de signalisation ERK/MAPK et participe également à la transformation cellulaire (Kliche et al., 2001).

e) micro-ARNs

Les micro-ARNs sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides régulant l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. HHV-8 est capable d'exprimer 24

micro-ARNs matures pendant la phase de latence codés par 12 pre-micro-ARNs (Pfeffer et al., 2005; Samols et al., 2005; Sullivan et al., 2006). L'expression de ces 24 micro-ARNs matures a été détectée dans toutes les cellules infectées par HHV-8 (Cai et al., 2005). Dans deux études, les auteurs ont analysé l'expression des pré-micro-ARNs d'HHV-8 dans des échantillons de biopsies de patients SK, PEL et dans des lignées immortalisées de PEL. Ces études montrent que ces pré-micro-ARNs de HHV-8 sont plus abondamment exprimés dans les échantillons des patients que dans les lignées de PEL et que leurs séquences sont très conservées entre les patients (Marshall et al., 2007; O'Hara et al., 2009).

Un nombre important d'ARNm cellulaires ou viraux ciblés par les micro-ARNs d'HHV-8 a été identifié. Les cibles de ces micro-ARNs sont impliquées dans différents processus cellulaires et viraux incluant la maintenance de la latence virale, l'échappement au système immunitaire, le cycle cellulaire, la survie, la prolifération cellulaire et l'apoptose.

HHV-8 code pour miR-K12-1 qui est capable de prévenir l'arrêt du cycle cellulaire en le liant directement à p21, protéine inhibitrice des Cdk-Cyclines, pour permettre la **prolifération** cellulaire (Gottwein and Cullen, 2010). HHV-8 peut aussi initier la **transformation** des lymphocytes B par l'expression de miR-K12-11, qui est un orthologue de miR-155, un micro-ARN oncogénique impliqué dans la différenciation des lymphocytes B (Boss et al., 2011; Gottwein et al., 2007; Skalsky et al., 2007). Le miR-K12-10 a un effet **anti-apoptotique** en inhibant la voie de signalisation de l'apoptose associée au TGF- β (Lei et al., 2012). De plus, dans des cellules transfectées par miR-K12-10 ou dans des cellules *de novo* infectées par HHV-8 on observe une diminution de l'expression de TWEAKER (TNF-like weak inducer of apoptosis receptor). La diminution de l'expression de TWEAKER a pour effet de prévenir l'apoptose et la production de **cytokines pro-inflammatoires** (Abend et al., 2010). Enfin, il a été démontré que les miR-K12-1, miR-K12-3 et miR-K12-4-3p peuvent diminuer l'expression de la caspase 3 et ainsi inhiber l'apoptose (Suffert et al., 2011).

Tableau 1. Principales protéines virales codées par HHV-8 au cours de la phase de latence et leur rôle dans la transformation cellulaire.

| ORF HHV-8 | Protéine virale | Rôle dans le cycle cellulaire du virus HHV-8 | Contribution dans l'oncogenèse par le virus HHV-8 |
|------------|-----------------|--|--|
| ORF 73 | LANA-1 | Essentielle à la persistance d'HHV-8; permet la réplication et assure la persistance des épisomes | Augmente la durée de vie des cellules infectées; Possède des propriétés anti-apoptotiques, s'associe à p53 et inhibe son activité transcriptionnelle; Induit la prolifération des cellules infectées, interagit avec la protéine pRB et active E2F; accumulation de la β -caténine; Régule sp1, c-Jun, c-Myc et Hras |
| ORF 72 | vCycline | Modulation du cycle cellulaire; contrôle la latence virale | Induit la prolifération des cellules infectées, phosphoryle pRB et favorise l'entrée en phase S; Possède des propriétés anti-apoptotiques, p27 et Bcl-2 |
| K13 | vFLIP | vFLIP active la voie de signalisation NF- κ B; bloque la réactivation lytique | Possède des propriétés anti-apoptotique, inhibe la caspase 8; Essentiel à la survie des cellules de PEL, active la voie de signalisation NF κ B |
| K12 | Kaposine B | Intéragie avec MK2 et module la voie de signalisation p38 afin de stabiliser l'ARNm de Prox1; induit la phosphorylation de STAT3 | Propriétés transformantes, active NK2 et stabilise PROX1; Induit la production de cytokines pro-inflammatoires |
| micro-ARNs | - | miR-K12-1 et miR-K12-3 module la voie de signalisation de NF κ B afin de réprimer la réplication lytique; miR-K12-5 réprime l'expression de RTA | Induit la prolifération, miR-K12-1 a pour cible p21; miR-K12-11 induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B; miR-K12-10 inhibe l'apoptose et la production de cytokines pro-inflammatoires; Possèdent des propriétés anti-apoptotiques, miR-K12-1, miR-K12-3 et miR-K12-4-3p inhibe la caspase 3 |

2. Phase lytique de HHV-8 et protéines associées

La phase lytique de HHV-8 peut avoir lieu suite à une primo infection ou lors d'une réactivation du virus dans les cellules infectées. Différents stress cellulaires peuvent induire la réactivation du virus tels que le stress oxydatif, l'hypoxie et certains traitements chimiques

(Chang et al., 2000; Davis et al., 2001; Gregory et al., 2009; Miller et al., 1997; Ye et al., 2011). L'immunosuppression, le déséquilibre de la production de cytokines inflammatoires et les co-infections virales peuvent également en être responsables (Tang et al., 2012; Vieira et al., 2001).

La réactivation lytique est le résultat de l'expression de tous les gènes du virus permettant en particulier d'aboutir à la formation de virions. L'expression de la protéine transactivatrice de la phase lytique RTA/ORF50 est requise pour initier cette phase du cycle viral de HHV-8. L'expression de RTA seule est suffisante pour conduire à une réplication lytique (Lukac et al., 1998; Sun et al., 1998), et la suppression de son expression prévient la réactivation lytique (Xu et al., 2005). De plus, parmi les protéines d'expression lytique, certaines (comme K1, v-GPCR, v-IL6 et K15) sont dotées de propriétés transformantes, favorisent la croissance cellulaire et exercent des fonctions anti-apoptotiques.

a) K1

Situé à l'extrémité gauche du génome de HHV- 8, à une position équivalente à celle des gènes codant la protéine LMP1 d'EBV, le gène K1 code pour une glycoprotéine transmembranaire apparentée à la superfamille des immunoglobulines (Brinkmann and Schulz, 2006; Tomlinson and Damania, 2008). K1 est constitutivement active et possède dans sa région C terminal un motif ITAM (Motif d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine) très conservé. L'ITAM est auto-phosphorylé et active de façon constitutive de multiples voies de signalisation intracellulaires en activant différentes protéines de signalisations (Lee et al., 2005; Prakash et al., 2005; Tomlinson and Damania, 2004) ce qui aboutit à l'activation de différents gènes **pro-inflammatoires** (IL6, IL1- β et IL8) et **angiogéniques** (VEGF) (Prakash et al., 2005) (Figure 3).

De plus, K1 est une protéine qui a des propriétés **transformantes**. Son expression dans les fibroblastes de rat induit l'immortalisation de ces cellules en culture (Lee et al., 1998).

Enfin, l'activation de la voie de signalisation Akt par la protéine virale K1 a un effet **anti-apoptotique**. Elle inhibe les facteurs de transcription de type Forkhead aussi appelés FOXO (Tomlinson and Damania, 2004). Les FOXO contrôlent l'arrêt du cycle cellulaire et peuvent déclencher la mort cellulaire par apoptose, ainsi son inhibition a pour effet de protéger les cellules infectées de l'apoptose (Wen and Damania, 2010). Par ailleurs, par un mécanisme unique la protéine K1 prolonge la durée de vie d'un lymphocyte B en régulant négativement

l'expression de surface du récepteur des lymphocytes B (BCR : B cell receptor) en se fixant à la chaîne C μ pour retenir ce complexe dans le réticulum endoplasmique.

Dans des modèles *in vivo* de souris transgéniques pour K1, la voie de signalisation NF κ B et la famille des Src tyrosine kinases sont constitutivement actives et certaines de ses souris développent des lymphomes plasmablastiques (Prakash et al., 2002).

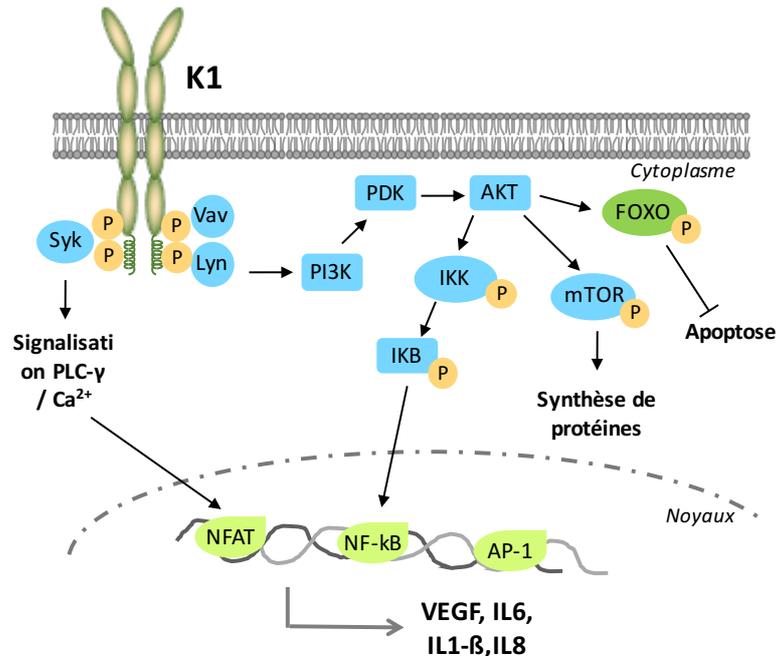


Figure 3. Rôles de la protéine lytique K1. Activation des voies de signalisation cellulaires aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ou angiogénique et à l'inhibition de l'apoptose. Les cercles oranges correspondent à une phosphorylation (Bhatt and Damania, 2012).

b) v-GPCR

La protéine v-GPCR (Viral G-protein-coupled receptor) codée par le gène viral ORF74, est une protéine transmembranaire qui partage des analogies avec le récepteur de l'IL8 cellulaire (Cesarman et al., 1996).

Dans des modèles *in vitro*, v-GPCR active un nombre important de voies de signalisation cellulaire (Montaner, 2007) ce qui entraîne la production de cytokines et chémokines **pro-inflammatoires** et de **facteurs de croissance** dont la production de VEGF et l'augmentation de l'expression de son récepteur (VEGFR) (Montaner, 2007) (Figure 4). Ainsi, à travers l'activation de ces voies de signalisation v-GPCR peut immortaliser et permettre la croissance de cellules endothéliales en culture (Bais et al., 2003; Montaner et al., 2001; Sodhi et al., 2006). v-GPCR a enfin le même effet **anti-apoptotique** que K1 via l'inhibition de FOXO.

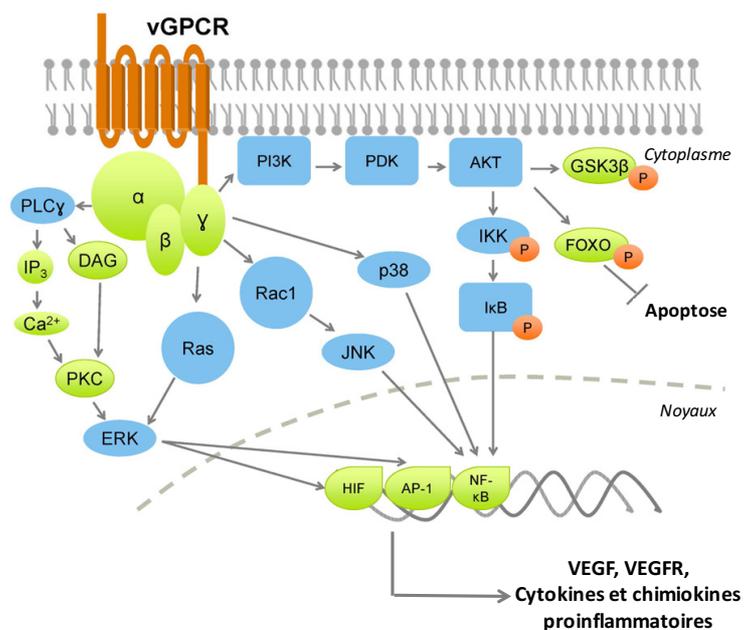


Figure 4. Rôles de la protéine lytique v-GPCR. Activation de voies de signalisation cellulaires aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance/angiogéniques et à l'inhibition l'apoptose. Les cercles oranges corresponde une phosphorylation (Bhatt and Damania, 2012).

Dans un modèle de souris transgéniques permettant l'expression spécifique de v-GPCR dans les cellules endothéliales, cette expression est suffisante pour induire la formation de lésions similaires à celles du SK chez les souris (Montaner et al., 2003). De la même manière que K1, l'expression de v-GPCR peut transformer les fibroblastes NIH3T3, ainsi que les cellules de primaire de rein de rat qui seront ainsi capables de former après injection des tumeurs chez les souris *nudes* (Bais et al., 1998). Enfin, des souris transgéniques, exprimant v-GPCR dans leurs cellules hématopoïétiques développent des lésions angiogéniques qui ressemblent à un SK systémique (Yang et al., 2000)

c) v-IL6

Le gène ORF K2 d'HHV- 8 code pour la cytokine IL6 virale (v-IL6, viral interleukine 6). Son expression est induite pendant la phase lytique, mais elle est aussi faiblement exprimée pendant la phase de latence (Aoki et al., 2001a; Aoki et al., 2001b). Cette protéine partage des analogies de séquence et des **homologies de fonction avec l'IL6 cellulaire** (Moore et al., 1996; Neipel et al., 1997a).

v-IL6 est capable d'entretenir la croissance de lignées murines et humaines IL6-dépendantes. Son effet s'exerce uniquement par le biais de la sous-unité gp130 du récepteur cellulaire de l'IL6, sans avoir recours à la sous-unité gp180 intracellulaire (Aoki et al., 2001b; Chow et al.,

2001; Wan et al., 1999). Elle induit différentes voies de signalisation : JAK/STAT, MAPK et PI3K/Akt/mTOR (Hideshima et al., 2000; Molden et al., 1997) qui conduisent à la régulation positive de l'expression de l'IL6 cellulaire (Mori et al., 2000), et du VEGF (Aoki et al., 1999). De plus, dans des modèles *in vitro*, l'expression de v-IL6 dans des fibroblastes murins induit la **transformation** de ces cellules et leur injection en sous-cutanée induit l'apparition de tumeurs chez les souris *nudes* (Aoki et al., 1999).

In vivo chez l'homme, l'expression de v-IL6 est limitée aux tumeurs hématologiques lymphoïdes B liées au HHV-8 (MCM et PEL) et v-IL6 se comporte comme un facteur de croissance autocrine des lignées de PEL (Chatterjee et al., 2002; Jones et al., 1999). De façon intéressante, dans un modèle de souris transgéniques l'expression de v-IL6 conduit à un syndrome clinique identique à celui des patients atteints de MCM (Suthaus et al., 2012). Ainsi, la v-IL6 joue un rôle majeur dans la physiopathologie de la maladie, par ses propriétés inflammatoires et angiogéniques.

d) K15/LAMP

Le gène K15 est localisé à l'extrémité droite du génome de HHV-8, à une position équivalente à celle du gène LMP2A (latent membrane protein-2A) du virus EBV. Le gène K15, dont il existe 2 allèles prédominant et mineur, donne naissance par épissage alternatif à plusieurs isoformes d'une protéine transmembranaire (Poole et al., 1999). Toutes partagent le même domaine C-terminal intracytoplasmique, pourvu de séquences conservées : un motif YEEVL (dont la tyrosine est phosphorylée de façon constitutive, probablement par les tyrosine-kinases Src) permettant la liaison de domaines SH2, une séquence riche en proline permettant la liaison de domaines SH3, un motif YASIL et un site de liaison des protéines TRAF (tumor necrosis factor receptor-associated factor). Tous ces motifs sont impliqués dans l'activation des voies de signalisation NF κ B, AP1 et des MAP kinases. Ces voies de signalisation active la transcription de **nombreuses cytokines et chémokines** cellulaire telles que IL6, IL8, CCL20, CCL2, CXCL3 et IL1 α/β (Brinkmann et al., 2003; Brinkmann et al., 2007; Cho et al., 2008).

Tableau 2. Principales protéines virales codées par HHV- 8 au cours de la phase lytique et leur rôle dans la transformation cellulaire.

| ORF HHV8 | Protéine virale | Rôle dans le cycle du virus HHV-8 | Contribution dans l'oncogenèse par HHV-8 |
|----------|-----------------|-----------------------------------|--|
| K1 | K1 | Régule la réplication lytique | Augmente l'angiogenèse des cellules endothéliales; Propriétés transformantes et oncogéniques, active la voie de signalisation NFkB; Active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR; Propriétés anti-apoptotique, inhibe FOXO et module l'expression du BCR; Augmente la perméabilité vasculaire |
| ORF 74 | vGPCR | Régule la réactivation lytique | Induit l'expression du VEGF et VEGFR; Active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR; Propriétés anti-apoptotique, inhibe FOXO |
| K2 | vIL6 | Régule la réactivation lytique | Active la voie de signalisation JAK/STAT, MAPK et PI3K/Akt/mTor; Active la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR; Active la voie de signalisation de l'IL6R, induit la prolifération des lymphocytes B; Induit la sécrétion du VEGF et de l'IL6; Augmente l'angiogenèse |
| K15 | LAMP | Régule la réplication lytique | Active la voie de signalisation NFkB; Induit la production de cytokines pro-inflammatoires |

II. Lymphocytes B et γ -Herpèsvirus

A. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les acteurs de l'immunité humorale. Ils dérivent des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et se différencient dans la Moelle Osseuse. Ils représentent 5 à 15% des lymphocytes circulants. Ces lymphocytes B sont caractérisés par leur capacité de reconnaître l'antigène sous sa forme native grâce à un récepteur polymorphe qui n'est autre qu'une molécule d'immunoglobuline membranaire qui sert de récepteur spécifique pour l'antigène (B cell receptor : BCR). Les immunoglobulines sont des hétérodimères protéiques composées de deux chaînes lourdes H (pour Heavy) et de deux chaînes légères L (pour Light) identiques. Chaque chaîne est composée d'une région constante C et d'une région variable V. L'association des domaines variables des chaînes lourdes et légères définit le site de fixation à l'antigène. Le BCR est associé aux molécules CD79a/b responsables de la transduction du signal après contact avec l'antigène. Différentes chaînes lourdes déterminent des classes d'immunoglobulines ou isotypes : γ , α , μ , δ , ϵ . Les chaînes légères sont soit κ soit λ . Le lymphocyte B mature activé se différencie soit en plasmocyte, la cellule effectrice de l'immunité humorale, soit en lymphocyte B mémoire. Le plasmocyte est la cellule productrice des anticorps qui constituent la forme sécrétée de la molécule d'immunoglobuline.

1. La lymphopoïèse B

a) Régulation transcriptionnelle de la lymphopoïèse B

La différenciation centrale des lymphocytes B est orchestrée par interventions séquentielles de différents facteurs de transcription. Au cours de cette différenciation lymphocytaire, les facteurs de transcription, en se fixant sur différents promoteurs et activateurs, sont impliqués dans l'engagement des précurseurs lymphoïdes dans la lignée B, ainsi que dans la quiescence, la survie et la mort des progéniteurs B. Selon le stade de différenciation certains facteurs sont prépondérants. La différenciation de CSH en progéniteurs lymphoïdes communs ou CLP (pour common lymphoid progenitors) constitue la première étape de la lymphopoïèse. La seconde étape qui correspond à la différenciation des CLP en cellules pro-B, est régulée par l'expression des facteurs de transcription E2A (Bain et al., 1994), qui régulent l'expression des gènes codant pour les recombinases RAG-1 et RAG-2, de l'hétérodimère $Ig\alpha/Ig\beta$ et de la

pseudo chaîne légère résultant de l'association des produits de gènes $\lambda 5$ et VpréB (Melchers, 2005). Les gènes E2A régulent également l'expression du facteur de transcription EBF (Early B-cell factor) dont l'expression est importante pour l'engagement des précurseurs dans la voie de différenciation en lymphocytes B (Hagman and Lukin, 2006). Pax-5 (Paired box protein 5) est le dernier facteur de transcription essentiel à la différenciation des CLP en lymphocytes B immatures. Sa fonction est de réprimer l'expression des gènes non-B et il est ainsi fortement associé à l'identité lymphocytaire B.

b) Genèse du récepteur à l'antigène des lymphocytes B

Le développement des lymphocytes B est orchestré par des remaniements séquentiels des gènes et segments de gènes codant pour les molécules des immunoglobulines. Les réarrangements successifs sur le locus de la chaîne lourde (jonction d'un segment D avec un segment J puis d'un segment V avec les segments DJ) permettent la synthèse d'une chaîne lourde μ intracytoplasmique si les segments VDJ sont en phase de lecture correcte dans les lymphocytes pro-B. Le pré-BCR constitué de la chaîne lourde μ associée à la pseudo-chaîne légère constituée de l'association de deux protéines $\lambda 5$ et VpréB, et d'un hétérodimère Iga/Ig β (ou CD79a/b) est alors exprimé à la surface des lymphocytes pré-B permettant le passage au stade ultérieur de la différenciation. L'expression du pré-BCR permet le processus d'exclusion allélique qui bloque le réarrangement de chaîne lourde sur le second allèle. Elle permet également de fournir un signal de survie à la cellule. Lors de la transition vers le stade "petite cellule pré-B" l'expression de $\lambda 5$ est perdue (Grawunder et al., 1995; Reth and Wienands, 1997). À ce stade les gènes des chaînes légères sont à leur tour réarrangés en débutant au locus Ig κ . Si aucun réarrangement productif sur les deux allèles ne s'est produit, ils se font au locus Ig λ (Schebesta et al., 2002). Le réarrangement VJ permet la production d'une chaîne légère qui remplace la pseudo chaîne légère et l'expression d'une IgM de surface conférant au lymphocyte sa spécificité de reconnaissance de l'antigène. Cette IgM de surface caractérise le stade B immature. Les lymphocytes immatures subissent un processus de sélection négative au cours duquel ceux possédant des immunoglobulines membranaires spécifiques pour les antigènes du soi sont éliminés, étape nécessaire à l'établissement de la tolérance B aux antigènes du "soi".

En plus de l'exclusion allélique, une exclusion isotypique a également lieu, afin que le lymphocyte B n'exprime qu'une seule chaîne légère soit κ soit λ . Chez l'homme, comme les réarrangements de la chaîne légère κ ont lieu avant les réarrangements de la chaîne légère λ ,

il y a plus de lymphocytes B qui expriment une chaîne légère κ . La distribution moyenne des lymphocytes B κ ou λ est approximativement de 65% / 35%. Un déséquilibre de ce ratio est indicatif d'une lymphoprolifération pathologique, reflétant la dominance d'un clone (Bhatt and Damania, 2012).

Les lymphocytes qui survivent à ces étapes, quittent la moelle osseuse pour se rendre dans les zones B des organes lymphoïdes secondaires.

2. Les sous-populations de B naïves

Dans les zones B des organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes B immatures vont subir une sélection périphérique ou éducation splénique. Dans la zone marginale de la rate, les interactions BCR-antigènes spléniques du soi vont déterminer si un lymphocyte B va se différencier en lymphocyte B folliculaire conventionnel impliqué dans les réponses humorales dépendantes des lymphocytes T ou en en lymphocyte B de la zone marginale impliqué dans les réponses humorales T indépendantes. Ainsi, les lymphocytes B naïfs peuvent être classés en 2 sous-populations majeures, les lymphocytes B folliculaires et les lymphocytes B de la zone marginale. Une sous-population supplémentaire, les lymphocytes dit B-1, a surtout été décrite chez la souris et l'équivalent humain de ces cellules fait encore l'objet d'un débat (Montecino-Rodriguez et al., 2006). Les lymphocytes B-1 représentent une faible fraction des lymphocytes B totaux (5%) et jouent un rôle prédominant dans l'immunité des muqueuses et la production d'IgA sur un mode thymo-indépendant. Dans cette partie nous ne nous intéresseront qu'aux lymphocytes B folliculaires et aux lymphocytes B de la zone marginale humains.

a) Lymphocytes B folliculaires

Les lymphocytes B folliculaires naïfs représentent 80% des lymphocytes B de la rate adulte et possèdent la capacité de coloniser les ganglions lymphatiques. Après activation par leur rencontre avec l'antigène, les lymphocytes B folliculaires peuvent soit se différencier rapidement de manière thymo-indépendante, c'est-à-dire sans avoir recourt à la coopération des lymphocytes T pour induire une réponse anticorps, en plasmocytes IgM à courte durée de vie (Cariappa et al., 2005) ; soit mettre en place une réponse humorale thymo-dépendante en formant des centres germinatifs où ils subissent les processus d'hypermutation somatique et de commutation isotypique (voir paragraphe II.3.a), avant de se différencier en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie.

Phénotypiquement les lymphocytes B folliculaires sont caractérisés par l'expression de CD23 et de l'IgD (forte), du récepteur du complément de type II CD21 (intermédiaire), de l'IgM (faible) et par l'absence des marqueurs CD11b et CD5.

b) Lymphocytes B de la zone marginale

Les lymphocytes B de la zone marginale sont spécialisés dans la réponse aux antigènes thymo-indépendants véhiculés par voie sanguine et représentent 10 à 15% des les organes lymphoïdes secondaires et du sang circulant. La vascularisation très riche de la zone marginale splénique, localisée entre le sinus marginal et la pulpe rouge, la place dans une position favorable pour drainer les antigènes et pathogènes véhiculés par le sang. Les lymphocytes B de la zone marginale sont capables de se différencier très rapidement en plasmablastes extrafolliculaires en réponse aux antigènes thymo-indépendants. Leur action est essentielle puisque ces cellules vont constituer la première ligne de défense contre certains micro-organismes comme les bactéries encapsulées. Cependant, il existe probablement une plasticité fonctionnelle des lymphocytes B de la zone marginale qui leur permettrait, lorsque les circonstances l'exigent, de répondre également à des antigènes thymo-dépendants (Phan et al., 2005; Song and Cerny, 2003).

Les lymphocytes B de la zone marginale agissent également comme cellules présentatrices d'antigènes glycolipidiques aux cellules iNKT (invariant natural killer T cells) grâce à leur forte expression de CD1d, une molécule apparentée aux molécules du CMH de classe I (Cinamon et al., 2008; Zietara et al., 2011).

Phénotypiquement les lymphocytes B de la zone marginale sont caractérisés par une forte expression du CD21 et des IgM associée à une faible expression du CD23 et des IgD (Spencer et al., 1998). Ces cellules expriment le marqueur mémoire CD27 mais n'ont pas subi la commutation de classe. Les lymphocytes B de la zone marginale ont des mutations somatiques dans les régions variables des gènes des immunoglobulines, le groupe de JC Weill suggèrent qu'elles pourraient être la signature d'un processus de diversification du répertoire par hypermutations non initiées par la reconnaissance antigénique (Weller et al., 2004).

3. Les réponses immunes B

Les antigènes sont divisés en deux grands groupes en fonction de leur nature physico-chimique, dictant elle-même la nature des coopérations cellulaires permettant d'aboutir à une

réponse anticorps. On distingue ainsi les antigènes thymo-dépendants et les antigènes thymo-indépendants.

a) Les réponses B thymo-dépendantes de type I

Les antigènes thymo-dépendants sont majoritairement de nature protéique. La notion de collaboration entre les lymphocytes T et les lymphocytes B pour l'induction d'une réponse anticorps effective remonte au début des années 70, en particulier avec les travaux de Gershon et Kondo montrant que l'absence de lymphocytes T chez des souris athymiques abolie la réponse anticorps contre un antigène protéique (Gershon and Kondo, 1970).

La mise en place de cette réponse humorale contre les antigènes thymo-dépendant nécessite la coopération de partenaires cellulaires : les lymphocytes T CD4 spécialisés, appelés lymphocytes T CD4 folliculaires helper (T_{FH}), les lymphocytes B spécifiques qui reconnaissent par leur BCR les peptides antigéniques présentés par les CMH de classe II exprimées par les cellules présentatrices de l'antigène (CPA). Elle a lieu dans deux sites distincts : la zone T où a lieu la réaction extra-folliculaire et les follicules où se développe la réaction du centre germinatif.

Les lymphocytes T_{FH} sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription Bcl-6 et c-Maf (Kroenke et al., 2012), par l'expression de protéines membranaires nécessaires à leur développement et leur activité ICOS, CXCR5, CXCR4, CD40L, SAP et PD-1 (programmed cell death protein 1) et par la sécrétion de cytokines, pour revue (Crotty, 2011; Vinuesa et al., 2005). La différenciation des lymphocytes T_{FH} se fait à partir des lymphocytes T naïfs qui reconnaissent les peptides antigéniques présentés par les molécules de classe II exprimées par les cellules dendritiques. En amont, les cellules dendritiques ont capturé l'antigène et ont subi des changements morphologiques, phénotypiques et fonctionnels. Elles expriment des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86) et le récepteur de chimiokine CCR7 lui leur permettra de migrer vers les organes lymphoïdes secondaires pour rencontrer les lymphocytes T naïfs. Les antigènes thymo-dépendants sont dégradés en peptides par la voie endosomale. Ils sont alors chargés sur les molécules du CMH de classe II. L'interaction entre le CMH II/peptide et le récepteur des lymphocytes T (TCR : T cell receptor) d'un clone T spécifique de l'antigène conduit à l'activation de ce dernier en T_{FH} .

La réaction extra folliculaire

Dans les organes lymphoïdes secondaires, à l'interface entre les zones T et B, les lymphocytes B ayant capturé l'antigène interagissent dans le contexte CMH-II/peptide-TCR, puis

CD40/CD40L, avec les lymphocytes T_{FH} spécifiques de l'antigène. Ces événements, associés à la production de cytokines par les lymphocytes T, induisent la prolifération des lymphocytes B ainsi que le mécanisme de commutation isotypique. Ce mécanisme permet de modifier l'isotype de la chaîne lourde de l'immunoglobuline (fragment constant) afin de l'adapter au mieux au rôle effecteur nécessaire, chaque classe d'Immunoglobuline ayant des propriétés fonctionnelles différentes. Le domaine variable demeure inchangé à ce stade. Cette commutation de classe est donc associée à une perte d'expression des IgM et des IgD et à l'expression d'un autre isotype (IgA, IgE, IgG).

La réaction du centre germinatif

Le centre germinatif constitue un microenvironnement dynamique au sein duquel les lymphocytes B subissent le processus de maturation d'affinité des anticorps. Ce processus est sous le contrôle de l'enzyme AID (Activation-Induced cytidine Deaminase) qui est exclusivement exprimée dans le centre germinatif (Honjo et al., 2002). AID introduit des mutations ponctuelles et aléatoires dans l'ADN, principalement dans les régions codant pour les domaines variables des gènes des immunoglobulines. L'affinité du BCR pour l'antigène va être ainsi modifiée (Victora et al., 2010), c'est le processus d'hypermutations somatiques. La réaction du centre germinatif est caractérisée par l'enchaînement de ce processus de mutations et du processus de sélection des clones B exprimant un BCR muté de forte affinité grâce aux cellules folliculaires dendritiques. Ces deux processus se déroulent respectivement dans la zone sombre et dans la zone claire des centres germinatifs les lymphocytes B hyper affins ainsi sélectionnés poursuivent leur différenciation en plasmocytes ou en cellules B mémoires à longue durée de vie.

b) Les réponses B thymo-dépendantes de type II

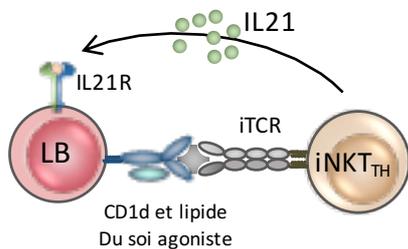
La réponse humorale thymo-dépendante de type II requiert une collaboration entre les lymphocytes B et les cellules iNKT (exprimant un TCR invariant voir paragraphe IV.A) (Barral et al., 2008; Leadbetter et al., 2008). Contrairement aux lymphocytes T CD4 ou CD8 conventionnels qui reconnaissent un peptide présenté par une molécule du CMH de classe II ou I respectivement, les cellules iNKT reconnaissent des glycolipides ou des phospholipides présentés par la molécule CD1d (Venkataswamy and Porcelli, 2010). La molécule CD1d est exprimée par de nombreuses cellules myéloïdes et par les lymphocytes B.

L'utilisation de l'antigène modèle α -Galactosyl Céramide (α -GalCer) a permis de montrer que les cellules iNKT CD4 peuvent adopter les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles

des lymphocytes T_{FH} , par leur expression du facteur de transcription Bcl-6 et des molécules CXCR5, PD1, BTLA, CD28 et SAP, et par leur capacité à induire la maturation des cellules B via leur expression du CD40L et leur sécrétion d'IL21 (Chang et al., 2011; Detre et al., 2012; Leadbetter et al., 2008). La réponse humorale pilotée par les cellules $iNKT_{FH}$ induit une maturation de l'affinité du BCR plus restreinte comparativement aux réponses thymo-dépendantes conventionnelles et ne conduit pas à l'émergence de lymphocytes B mémoires ou de plasmocytes (Chang et al., 2011; King et al., 2011; Tonti et al., 2012).

Les cellules $iNKT$ fournissent aux lymphocytes B aussi bien de l'**aide innée** (dite directe, sans besoin de sensibilisation par un antigène) qu'adaptative (dite indirecte avec sensibilisation par un antigène) (Vomhof-DeKrey et al., 2014). Dans le cadre de l'aide innée, elles interagissent **directement** avec la molécule CD1d de la cellule B présentatrice de l'antigène. Une fois activées, elles régulent la costimulation moléculaire, incluant CD40L, et libèrent des quantités considérables de différentes cytokines Th1 ou Th2 (Figure 5A). Galli et al. ont été les premiers à démontrer que les cellules $iNKT$ participaient à la maturation des lymphocytes B. Chez l'homme, ils montrent que les cellules $iNKT$ induisent *in vitro* l'expansion de lymphocytes B purifiés naïfs et mémoires et entraînent leur sécrétion d'IgM et d'IgG et ce de façon dépendante de la molécule CD1d (Galli et al., 2003). Les cellules $iNKT$ qui interviennent dans l'aide directe aux lymphocytes B adoptent un phénotype similaire à celui des T_{FH} et sont ainsi définies comme des cellules $iNKT_{TH}$. Ces cellules sont localisées à la frontière entre la zone T et la zone B, et dans les centres germinatifs (Chang et al., 2011). Enfin, les réponses lymphocytaires B dirigées de manière directe par les cellules $iNKT_{TH}$ induisent une maturation de l'affinité du BCR plus restreinte que lors d'une réponse thymo-dépendante conventionnelle et ne conduisent pas à l'émergence de lymphocytes B mémoires (Chang et al., 2011; King et al., 2011).

A. Les cellules iNKT fournissent de l'aide innée aux lymphocytes B



B. Les cellules iNKT fournissent de l'aide adaptative aux lymphocytes B

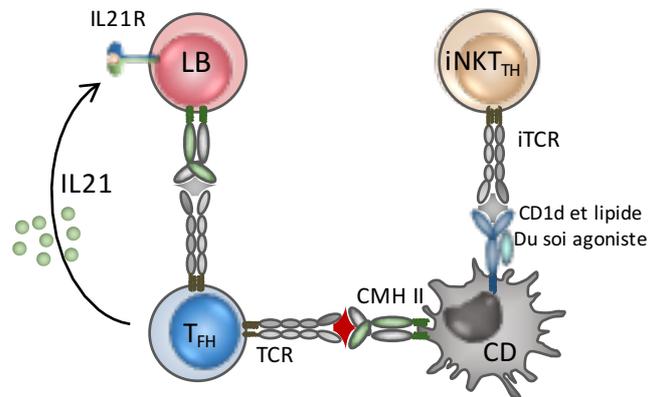


Figure 5. Les cellules iNKT fournissent de l'aide aux lymphocytes B par 2 mécanismes distincts. A. Les cellules iNKT fournissent de l'aide innée ou directe aux lymphocytes B. **B.** les cellules iNKT fournissent de l'aide adaptative ou indirecte aux lymphocytes B.

Les cellules iNKT peuvent aussi fournir de l'**aide adaptative** aux lymphocytes B de manière **indirecte** (Figure 5B). Après activation des cellules iNKT par leur TCR, elles induisent la maturation des cellules dendritiques qui à leur tour activent les lymphocytes T CD4⁺ naïfs. Ces lymphocytes T spécifiques de l'antigène, subissent une expansion clonale et certains se différencient en lymphocytes T_{FH}. Ces lymphocytes T_{FH} par l'interaction directe de leur TCR avec la molécule du CMH de classe II, l'engagement des molécules de costimulation et la production de cytokines telle que l'IL21 induisent une réponse humorale efficace, une maturation de l'affinité et le développement de lymphocytes B mémoires. Dellabona et al. montrent de plus que cette coopération permet également la différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B mémoires (Dellabona et al., 2014).

c) Les réponses B thymo-indépendantes

Bien que la réponse humorale contre une grande majorité des protéines antigéniques nécessite la présence de lymphocytes T auxiliaires, des animaux déficients en lymphocytes T sont capables de développer une réponse anticorps dirigée contre une grande variété de bactéries. Ce phénomène est lié à la propriété de certains antigènes bactériens d'activer les lymphocytes B sans aide des lymphocytes T. De tels antigènes sont dits T-indépendants. L'activation des cellules B par ces antigènes est en général peu spécifique. On distingue deux types d'antigènes T-indépendants.

Les antigènes thymo-indépendants de type 1, comme le LPS (lipopolysaccharide), qui engage à la surface de la cellule B un corécepteur du BCR, très souvent un TLR (Toll Like Receptor), le TLR 4 en l'occurrence pour les LPS. Ces antigènes sont donc capables d'activer directement la prolifération des lymphocytes B. À forte concentration, ils induisent la prolifération et la différenciation d'une grande majorité des lymphocytes B, quelle que soit leur spécificité. De façon polyclonale. Cette réponse est plus rapide que la réponse thymo-dépendante car elle ne requiert pas d'activation préalable et d'expansion des lymphocytes T auxiliaires. Cependant, les antigènes thymo-indépendants de type 1 n'induisent pas de commutation isotypique, de maturation de l'affinité ou de lymphocytes B mémoires.

Les antigènes thymo-indépendants de type 2 tels que les polysaccharidiques ou les capsides virales, sont de grosses molécules ou structures présentant des motifs répétés permettant d'agrèger à la surface du lymphocyte B les BCR, ce qui induit un signal d'activation très fort. Alors que les antigènes thymo-indépendants de type 1 peuvent activer indifféremment les lymphocytes B matures et immatures, les antigènes thymo-indépendants de type 2 activent seulement les lymphocytes B matures.

Les lymphocytes B de la zone marginale de la rate ou d'autres organes lymphoïdes interviennent dans les réponses immunes T indépendantes et sont de fait la première ligne de défense contre certains micro-organismes comme les bactéries encapsulées (LeBien and Tedder, 2008). En effet, des souris déficientes en lymphocytes B de la zone marginale montrent un défaut spécifique de réponse thymo-indépendante de type 2 après immunisation, caractérisé par une diminution drastique de sécrétion d'IgM, IgG3 et IgG2a (Guinamard et al., 2000). Contrairement aux réponses T-dépendantes dont la mise en place est relativement longue (une semaine), la réponse aux antigènes T-indépendants est très rapide avec la génération d'un pool maximal de plasmablastes dès J3 (Martin et al., 2001). Cette réponse rapide est due à un état de « pré-activation » constitutif des lymphocytes B de la zone marginale. Ces cellules répondent plus rapidement et plus intensément après stimulation de leurs BCR ou TLRs (Oliver et al., 1997; Oliver et al., 1999) et expriment un niveau basal du facteur de transcription plasmablastique Blimp-1 (B Lymphocyte Induced Maturation Protein 1, codé par le gène PRDM-1) contrairement aux lymphocytes B folliculaires (Martin et al., 2001). Une fois l'activation et la différenciation des lymphocytes B de la zone marginale en plasmablastes engagée, un signal de survie via le récepteur TACI est requis (Balazs et al., 2002). En effet l'inactivation de l'expression du gène qui code pour ce récepteur inhibe significativement la réponse lymphocytaire B thymo-indépendante sans affecter la réponse thymo-dépendante (von Bulow et al., 2001)

4. Les lymphocytes B mémoires

Les lymphocytes B mémoires sortent du centre germinatif et vont rejoindre la circulation sanguine et les tissus. Le BCR exprimé sur ces lymphocytes B mémoires présente une très forte affinité pour un antigène donné, expriment les isotypes IgG, IgM, IgA ou IgE et ne secrètent pas d'anticorps. Les lymphocytes B mémoires sont capables de persister à l'état quiescent sans proliférer, de plusieurs mois à plusieurs dizaines d'années chez l'homme, pour revue (Kurosaki et al., 2015). Ils ont la faculté de répondre très rapidement à des pathogènes en présentant rapidement et efficacement l'antigène aux lymphocytes T lors d'une réponse secondaire puis en se différenciant en plasmocytes.

5. La différenciation plasmocytaire

Les plasmocytes sont les cellules effectrices de la réponse immunitaire humorale par la production et la sécrétion d'anticorps. Leur durée de vie dépend des signaux reçus lors de la stimulation antigénique. Les plasmocytes passent par un stade « transitoire » de plasmablastes : ce sont des cellules en cycle avec des propriétés migratoires qui expriment une immunoglobuline de surface alors que les plasmocytes ne sont plus circulants, ne divisent plus et ont perdu leur immunoglobuline. Les plasmocytes sont des médiateurs à longue durée de vie de l'immunité humorale. La différenciation terminale des lymphocytes B est un processus gouverné par un réseau de gènes régulateurs et par les stimulations de l'environnement.

a) Rôle des Cytokines

In vitro, des agonistes du BCR et du CD40 ne sont pas suffisant pour se substituer aux lymphocytes T pour permettre la différenciation en plasmocytes. En effet, les lymphocytes T fournissent un 3^{ème} signal, distinct du ligand du CD40, permettant d'induire la différenciation plasmocytaire. Ce signal est délivré par les différentes cytokines.

L'**IL21**, produite majoritairement par les lymphocytes T CD4 et les iNKT après leur polarisation en T_{FH} induit la commutation isotypique et l'expression de facteurs de transcription impliqués dans la différenciation plasmocytaire (Avery et al., 2008; Ettinger et al., 2005; Pene et al., 2004). L'**IL6** en synergie avec les IFN de type I produits entre autres par les cellules dendritiques plasmacytoïdes, jouent également un rôle dans la différenciation des plasmocytes et la production d'immunoglobulines (Jego et al., 2003). L'**IL10** induit la

différenciation plasmocytaire de lymphocytes B humains préalablement activés par l'engagement du CD40 et/ou du TLR9, sur un mode paracrine ou autocrine (Rousset et al., 1992). La p28/Cytokine-like factor-1 produite par les cellules présentatrices d'antigènes permet également la différenciation plasmocytaire en activant la voie STAT3 et induit la commutation isotypique (Tormo et al., 2013). Les cytokines **BAFF** et **APRIL** participent la différenciation plasmocytaire lors d'une réponse humorale aux antigènes thymo-indépendants et induisent la commutation isotypique (Avery et al., 2003). Enfin, **CXCL10** permet la différenciation plasmocytaire en activant la voie STAT3 (Xu et al., 2012).

b) La régulation transcriptionnelle

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes dépend d'un réseau de facteurs de transcription et de répresseurs transcriptionnels. Il existe 4 acteurs transcriptionnels majeurs de la différenciation plasmocytaire : Pax-5, Blimp-1, Bcl-6 et XBP-1. L'identité plasmocytaire s'établit chronologiquement lorsque l'expression des régulateurs transcriptionnels de l'identité B est réprimée et que l'expression de ceux de l'identité plasmocytaire est induite (Figure 6), et ci-dessous en revue chronologique.

Pax-5 est le gardien de l'identité lymphoïde B. Il est exprimé tout au long du développement des lymphocytes B (Fuxa and Busslinger, 2007), et son expression est requise pour l'engagement des progéniteurs dans la lignée B (Nutt et al., 1999). Dans les lymphocytes B immatures, Pax-5 régule l'expression des composants du BCR, de CD19 et CD21, et des facteurs de transcription IRF4 (interferon-regulatory factor 4), IRF8, Bach-2 et SPIB (Pridans et al., 2008; Schebesta et al., 2007). De fait, l'expression de Pax-5 doit être réprimée pour permettre la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. En effet, l'inactivation de son expression va induire l'émergence d'un phénotype plasmablastique caractérisé par une augmentation de l'expression des facteurs de transcription Blimp-1 et XBP-1 (Nera et al., 2006).

Bach-2 est un répresseur transcriptionnel exprimé au cours du développement des lymphocytes B et son expression est sous le contrôle positif de Pax-5 (Schebesta et al., 2007). Bach-2 ne joue pas un rôle direct dans la différenciation en lymphocytes B matures, cependant, sa cible principale est Blimp-1 qu'il réprime (Muto et al., 2010). Ainsi, en absence de l'expression de Bach-2, la formation de lymphocytes B matures est quand même normale, mais lorsque ces cellules sont activées, Blimp-1 est exprimé de manière prématurée ce qui augmente leur potentiel de différenciation en plasmocytes après leur exposition à l'antigène

(Kometani et al., 2013). **Bcl-6** est un répresseur transcriptionnel très fortement exprimé par les lymphocytes B du centre germinatif et son expression est indispensable à la formation des centres germinatifs (Basso and Dalla-Favera, 2012). L'expression de Bcl-6 est régulée positivement par le facteur de transcription IRF8 (Lee et al., 2006) et négativement par les facteurs de transcription IRF4 et Blimp-1 (Cimmino et al., 2008; Saito et al., 2007). La perte de l'expression de Bcl-6 est nécessaire pour que les cellules du centre germinatif se différencient en plasmablastes. **IRF4** est essentiel pour les réponses B, telles que la commutation isotypique et la formation de centres germinatifs, et la différenciation plasmocytaire. Il participe à la différenciation plasmocytaire en inhibant directement l'expression de Bcl-6 et en induisant l'expression de Blimp-1 (Sciammas et al., 2006; Shaffer et al., 2008). **Blimp-1** est un répresseur transcriptionnel qui conduit à la différenciation terminale des lymphocytes T et B, pour revue (Nutt et al., 2007). Au cours de la différenciation B, Blimp-1 est exprimé exclusivement dans les cellules plasmocytaires, pour revue (Shapiro-Shelef and Calame, 2005). Son expression dans les lymphocytes B est suffisante pour induire la différenciation de ces cellules en plasmocytes en induisant un arrêt du cycle cellulaire et la mise en route d'un programme de sécrétion des immunoglobulines (Knodel et al., 2001). Pour cela, il réprime des gènes Pax-5 et Bcl-6. Enfin, **XBP-1** (X-box binding protein 1) est un facteur de transcription qui est fortement exprimé par les plasmocytes. Dans les lymphocytes B, Pax-5 inhibe l'expression de XBP-1, et la régulation négative de l'expression de Pax-5 au cours de la différenciation plasmocytaire contribue à l'activation de l'expression de XBP-1 (Reimold et al., 1996). L'inactivation du gène codant pour XBP-1 dans les lymphocytes B ne semble pas affecter la formation de cellules plasmocytaires (Taubenheim et al., 2012; Todd et al., 2009). Cependant, l'expression de XBP-1 est indispensable à la fonction sécrétrice des plasmocytes en contrôlant directement l'expansion du réticulum endoplasmique. L'expression de XBP-1 induit une augmentation de la taille de la cellule et l'augmentation de la synthèse de protéique, caractéristique des plasmocytes (Shaffer et al., 2004).

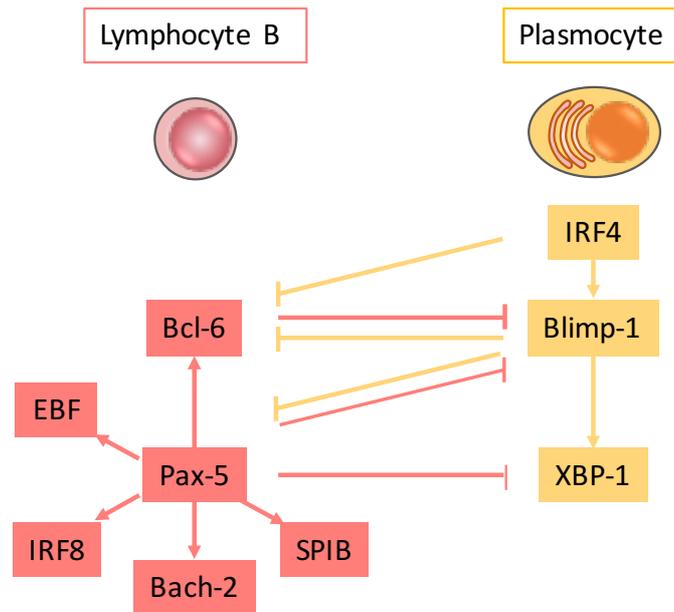


Figure 6. Synthèse des interactions entre les facteurs de transcriptions clés du processus de différenciation plasmocytaire.

B. Les γ -Herpèsvirus altèrent la voie de différenciation des lymphocytes B

Parmi les herpèsvirus seuls les γ -herpèsvirus incluant EBV et HHV-8 peuvent induire une transformation tumorale des cellules infectées chez l'Homme. Le rôle pathologique de ses deux virus a été démontré dans de nombreuses lymphoproliférations B (Boshoff and Weiss, 2002; Kuppers, 2003). En particulier, EBV est associé au développement de la maladie de Hodgkin et du lymphome de Burkitt à la fois chez les patients immunocompétents et immunodéprimés, mais également au développement du lymphome immunoblastique des patients immunodéprimés (Kuppers, 2003). De la même manière, l'infection par HHV-8 est associée au développement de la MCM (Dupin et al., 2000) et du PEL (Chang et al., 1994) principalement chez des sujets immunodéprimés (infectés par le VIH, post greffe d'organe, âgés) et ces deux pathologies ont pour origine des lymphocytes B infectés par HHV-8.

1. Les lymphocytes B sous l'influence de l'infection par l'EBV

Lorsqu'un lymphocyte B naïf folliculaire interagit avec un antigène, il est activé et prolifère. Le lymphocyte B activé rentre dans le follicule, se multiplie et forme le centre germinatif. À ce stade, la survie des lymphocytes B activés dépend de leur capacité à recevoir les signaux de survie grâce à leurs interactions avec les cellules dendritiques folliculaires et avec les

lymphocytes T helper. De la même manière, l'infection des lymphocytes B par l'EBV va avoir pour conséquence d'activer ces cellules et de les faire proliférer suite à l'expression des gènes de latence du virus (Babcock et al., 2000; Price and Luftig, 2015). Ainsi, l'expression des protéines virales LMP-1 et LMP-2 mime les signaux de survie normalement procurés par les interactions avec l'antigène et les lymphocytes T helper et permet aux cellules B infectées de se différencier en cellules B mémoires au sein de centres germinatifs. LMP-1, considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV, mime le récepteur CD40 et active la voie de signalisation NFκB (Kilger et al., 1998). Contrairement aux récepteurs cellulaires dont l'activation dépend d'un ligand agoniste, LMP-1 est constitutivement active, pour revue (Kuppers, 2003). La protéine virale LMP-2A se distingue par la présence des motifs ITAM similaire à ceux du BCR. Cette protéine confère un signal de survie aux lymphocytes B, leur permettant d'échapper à l'apoptose en l'absence de sélection dans les centres germinatifs (Caldwell et al., 1998). De plus, LMP-2A a un rôle dans la résistance à l'apoptose qui serait lié à sa capacité à induire la voie de signalisation de la PI3K (Caldwell et al., 1998). Enfin, LMP-2A peut également activer l'oncogène RAS de façon constitutive, favorisant ainsi la prolifération et la survie des lymphocytes B (Portis and Longnecker, 2004).

Au total, l'EBV après avoir infecté les lymphocytes B naïfs induit leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B mémoire, pour revue (Kuppers, 2003).

Le lymphocyte B infecté quitte ensuite les follicules en tant que lymphocyte B mémoire et rejoint la circulation périphérique. À partir de là, plus aucune protéine virale n'est exprimée ce qui permet au virus d'échapper au système immunitaire et de persister dans l'organisme. Lors de la division de la cellule B infectée, la protéine EBNA-1 est ré-exprimée pour permettre le maintien et la division du génome viral. Enfin, au cours de la phase de réactivation virale (dont les signaux inducteurs restent mal connus), l'activation des protéines de la phase lytique va induire une différenciation des lymphocytes B mémoires infectés en plasmocytes (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005).

2. Les lymphocytes B sous l'influence de l'infection par HHV-8

a) Caractéristiques de la lymphoprolifération B du PEL

Cellules B avec un phénotype plasmocytaire

Des premières études montrent que les caractéristiques morphologiques et immunophénotypiques de la cellule tumorale du PEL que cette cellule provient de lymphocytes B en maturation terminale. En effet, cette cellule n'exprime pas les antigènes

associés aux lymphocytes B (CD19, CD20 et Ig) (Matolcsy et al., 1998), elle exprime le CD45 et les antigènes d'activation tels que CD30, CD38, CD71 et HLA-DR (Ansari et al., 1996). De plus, les cellules du PEL expriment syndecan-1/CD138 (Gaidano et al., 1997), qui est sélectivement exprimé par une sous-population de pré-lymphocytes B et par les plasmocytes. Cependant malgré cette absence d'expression de gènes associés à la différenciation en lymphocytes B et d'immunoglobulines de surface, la présence de réarrangements des gènes des immunoglobulines confirme leur origine lymphocytaire B.

Deux études transcriptomiques montrent que les cellules du PEL expriment fortement les facteurs de transcription majeurs dans la différenciation terminale des lymphocytes B Blimp-1 et IRF4, et expriment faiblement les gènes associés aux lymphocytes B matures (Jenner et al., 2003; Klein et al., 2003). Cette faible expression de gènes de lymphocytes B matures montre que les cellules du PEL ont complété leur différenciation en plasmocytes, phase critique contrôlée par le facteur de transcription Blimp-1. Ces cellules dites plasmablastiques ou plasmocytaires, présentent une expression très élevée du facteur de transcription XBP-1 et des gènes cibles de l'UPR (unfolded protein response), une réponse adaptative induite lors de l'accumulation de protéines mal conformées dans le réticulum endoplasmique (RE), afin de protéger la cellule contre ce stress.

Au total, les profils phénotypique et transcriptionnel de ces cellules indiquent bien que les cellules tumorales du PEL représentent des cellules matures en différenciation préterminale, plasmablastes ou plasmocytes (Jenner et al., 2003; Klein et al., 2003).

Cellules B clonales issues du centre germinatif

La présence de mutations somatiques au niveau des gènes codant la chaîne variable (V) de l'immunoglobuline, caractéristique de la réponse immune à l'antigène T-dépendante, et la présence de mutations de la région non codantes du gène Bcl-6 (Gaidano et al., 1999b), impliquent que les cellules à l'origine du PEL ont transité par le centre germinatif des organes lymphoïdes périphériques. De plus, la cellule du PEL présente le profil moléculaire suivant : Bcl-6⁻, MUM-1/IRF4⁺, CD138/syndecan-1, qui correspond à celui d'une cellule ayant passé par le centre germinatif (Klein et al., 2003).

Les clones tumoraux du PEL sont infectés par HHV-8 et dans la majorité des cas co-infectés par l'EBV tout comme les deux lignées cellulaires BC1 et BC2. Au contraire, les lignées immortalisées issues de PEL BC3 et BCL1, ne sont pas co-infectées par l'EBV et ne présentent pas de mutations somatiques (Matolcsy et al., 1998). Il est bien établi que HHV-8 est directement responsable de la transformation tumorale de ces cellules, cependant

l'apparition des mutations somatiques retrouvées uniquement en situation de co-infection pourrait de fait être liée à l'EBV.

Ces données ainsi que l'observation de l'expression de nombreux antigènes plasmocytaires permettent d'affirmer que les cellules du PEL sont à un stade de différenciation lymphocytaire B très avancé.

b) Caractéristiques de la lymphoprolifération B de la MCM

Cellules B avec un phénotype plasmablastique

La MCM est caractérisée par la présence de lymphocytes B particuliers localisés dans les follicules secondaires et positifs pour la protéine virale LANA. Ces lymphocytes B de grande taille ont un aspect morphologique de plasmablastes. Ils sont toujours localisés dans la zone du manteau des follicules secondaires (Dupin et al., 2000). De toutes les cellules présentes dans la lésion de la MCM, ce sont les seules à être positives pour la protéine virale LANA et donc infectées par HHV-8 (Chadburn et al., 2008). Contrairement aux cellules du PEL, les lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 de la MCM ne sont jamais co-infectés par l'EBV. Leur phénotype, analysé en immunohistochimie, est celui d'un lymphocyte B en différenciation plasmocytaire. Ils sont CD27 variable, CD20 variable (initialement décrit comme positif par Dupin et al. et négatif dans les études ultérieures), CD30⁻, CD38⁺, Ki67⁺⁺. Ils expriment les facteurs de transcription Blimp-1 et IRF4 mais pas les facteurs de transcription Pax-5 et Bcl-6 (Chadburn et al., 2008). La cytokine virale v-IL6 est fortement exprimée dans 10 to 15% de ces lymphocytes B qui expriment LANA et tous expriment à leur surface le récepteur de l'IL6 humaine (Brousset et al., 2001). v-IL6 a des homologues de structure et de fonction avec l'IL6 cellulaire qui est un facteur indispensable à la survie des lymphocytes B (Cassese et al., 2003). Il a été suggéré que l'IL6 virale joue un rôle majeur dans la différenciation en plasmablastes des lymphocytes B infectés et dans le développement des lésions lymphoprolifératives sans que ces cellules n'aient besoin de passer par le centre germinatif (Hu et al., 2015). En effet, v-IL6 ainsi que son analogue humain sont capables d'induire l'expression du facteur de transcription XBP-1 impliqué dans la sécrétion d'immunoglobulines par les plasmocytes (Todd et al., 2009).

Cellules B polyclonales qui ne sont pas issues du centre germinatif

Les lymphocytes B caractéristiques de la MCM sont paradoxalement monotypiques, exprimant uniquement une IgM restreinte à la chaîne légère λ . Bien que monotypiques, ces lymphocytes B infectés par HHV-8 sont polyclonaux comme le suggèrent les réarrangements

des chaînes VH et VL de l'IgM (Dupin et al., 2000). De plus, l'analyse de leur répertoire du BCR confirme leur polyclonalité mais aussi l'absence de mutations somatiques les apparentant à des cellules naïves malgré leur aspect plasmablastique (Du et al., 2001). Ces lymphocytes B IgM⁺ sans mutations somatiques étant considérés comme des lymphocytes B naïfs, il a été émis l'hypothèse qu'HHV-8 infecterait ces cellules dans un premier temps puis induirait leur différenciation vers la cellule pathologique infectée par HHV-8 observée dans la MCM.

À ce jour, aucune donnée expérimentale ne peut affirmer le contraire, mais néanmoins grâce la description récente des lymphocytes B de la zone marginale (mémoire IgM), une hypothèse alternative est peut être émise. Les lymphocytes B de la zone marginale sont présents dans la rate, le sang et les amygdales où ils fournissent une première ligne de défense contre les pathogènes en proliférant rapidement après stimulation par les antigènes du pathogène. Cette capacité à proliférer rapidement les rend cible potentielle pour l'infection par HHV-8. Les lymphocytes B de la zone marginale expriment le CD27 et très fortement l'IgM, et contrairement aux lymphocytes B mémoires switchés, ces cellules ne présentent pas de mutations somatiques (Weller et al., 2004), comme les plasmablastes infectés par HHV-8 de la MCM. De plus, il a été démontré que HHV-8 infectait *in vitro* préférentiellement les lymphocytes B mémoire IgM ou il établissait une infection latente (Hassman et al., 2011). Enfin, dans des expériences de différenciation plasmocytaire *in vitro*, Jourdan et al. montrent que les lymphocytes B mémoires CD27⁺ (comprenant les lymphocytes B de la zone marginale et mémoires switchés) se différencient en plasmablastes, qui présentent un profil d'expression de gènes similaire à celui des plasmablastes infectés par HHV-8 de la MCM (Blimp-1⁺, IRF4⁺, Bcl-6⁻, et Pax-5⁻) (Jourdan et al., 2009). Cette étude montre aussi que les lymphocytes B de la zone marginale sont IgM⁺⁺, Ki67⁺ et expriment de manière variable la molécule CD27 durant la différenciation en plasmablastes. L'ensemble de ces données permettent de suggérer que les cellules plasmablastiques infectées par HHV-8 présentes dans la MCM pourraient dériver des lymphocytes B de la zone marginale plutôt que de lymphocytes B naïfs.

c) HHV-8 est associé à une différenciation terminale des lymphocytes B

(1) Lors de l'infection latente

Hassman et al. montrent dans des expériences de culture de lymphocytes B d'amygdales en présence du virus HHV-8, que le virus établit une infection latente et persistante

exclusivement dans les lymphocytes B monotypiques $IgM^+ \lambda^+$ (Hassman et al., 2011). Cette population représente 20% des lymphocytes B des amygdales et possède une plus grande capacité de prolifération comparativement aux lymphocytes B $IgM^+ \kappa^+$ (Derudder et al., 2009). Cette étude montre également que l'infection par HHV-8 est capable d'induire la prolifération et la différenciation plasmocytaire des cellules infectées. Ces cellules acquièrent caractéristiques morphologiques de plasmablastes, une expression forte la chaîne lourde IgM et de la chaîne légère λ , ainsi qu'une expression de CD27, Ki67 et IL-6R. De plus l'adjonction d'IL6 *in vitro*, renforce les modifications blastiques de ces cellules comparativement à des cellules infectées par HHV-8 seul. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature qui montrent que l'IL6 induit aussi la croissance, la différenciation et la survie des plasmablastes dans un contexte non pathologique. À noter que cette cytokine est aussi responsable des symptômes cliniques de la MCM associée à l'infection par HHV8 (Hassman et al., 2011). Ainsi, ces travaux montrent que le virus HHV-8 infecte préférentiellement les lymphocytes B mémoires $IgM^+ \lambda^+$, que cette infection conduit à la différenciation plasmablastique de ces cellules et enfin suggèrent que l'IL6 joue un rôle important dans ces phénomènes.

Parmi les gènes viraux exprimés au cours de la phase de latence d'HHV-8, v-FLIP joue un rôle majeur dans la transformation associée à l'infection par HHV-8 (Chaudhary et al., 1999). Dans un modèle d'étude de souris transgéniques, qui expriment de manière conditionnelle v-FLIP sélectivement dans leurs lymphocytes B, les auteurs ont analysé l'effet de l'expression de cette oncoprotéine sur la différenciation lymphocytaire B. Ces souris transgéniques pour v-FLIP développent des anomalies des lymphocytes B similaires à celles de la MCM. L'analyse histologique de ces lymphocytes B montre qu'ils résident dans la zone du manteau, sont négatifs pour l'expression de la molécule CD138, expriment très fortement Ki67, et présentent des caractéristiques morphologiques similaires aux plasmablastes observés dans les lésions de la MCM (Ballon et al., 2011). De plus, l'expression de v-FLIP par les lymphocytes B altère la formation des centres germinatifs. Enfin, cette étude montre que l'expression de v-FLIP *in vivo* conduit à une augmentation de l'incidence tumorale puisque toutes les souris transgéniques pour v-FLIP développent des tumeurs localisées dans des zones riches en tissus lymphoïde (Ballon et al., 2011).

Au total, ces études expérimentales suggèrent que le virus HHV-8 est capable d'induire la différenciation en plasmablastes et la prolifération des lymphocytes B qu'il infecte et que l'expression de v-FLIP serait impliquée dans ces processus.

(2) Lors de la réactivation lytique

Des observations récentes montrent que la réactivation du virus HHV-8 et donc sa propagation dans l'hôte dépend de la différenciation plasmocytaire. Wilson et al. montrent que l'induction de la réplication par un stimulus de stress du virus HHV-8 dans les lymphocytes B infectés de manière latente est secondaire à l'expression du facteur de transcription XBP-1 (Wilson et al., 2007). L'expression de XBP-1s est suffisante pour initier la phase lytique d'HHV-8 en activant directement le promoteur d'ORF50/RTA, sans que le mécanisme précis de cette réactivation lytique ne soit à l'heure actuelle déterminé (Wilson et al., 2007). Dans cette étude, Wilson et al. montrent par des modèles *in vitro*, que l'expression de la forme activée du facteur de transcription XBP-1 (XBP-1s) est induite par le stress du réticulum endoplasmique dans des cellules de PEL. Une récente étude montre que XBP-1 peut également se lier et activer le promoteur de la protéine virale v-IL6, cytokine indispensable à la prolifération, la survie et à la transformation des lymphocytes B infectés par HHV-8 (Hu et al., 2015).

Au total, ces études démontrent que la différenciation plasmocytaire est permissive à la réactivation lytique du virus HHV-8 et permet de fait sa dissémination.

C. Les γ -Herpèsvirus altèrent la prolifération des lymphocytes B

1. Parallèle entre EBV et HHV-8 pour leurs rôles sur la prolifération des lymphocytes B

Le virus HHV-8 est capable comme l'EBV d'induire la prolifération des lymphocytes B en utilisant différentes stratégies virales. Les gènes viraux de l'EBV qui sont impliqués dans la lymphoprolifération sont exclusivement exprimés durant la phase de latence, et généralement ces gènes ne contrôlent pas les fonctions cellulaires directement, mais induisent des protéines cellulaires, qui à leur tour contrôlent les fonctions de la cellule. Au contraire, comme déjà présenté plus haut, le génome viral d'HHV-8 contient les gènes viraux qui sont des homologues de gènes cellulaires impliqués dans le contrôle de la prolifération et de l'apoptose. Ces gènes viraux impliqués dans la mise en place des lymphoproliférations B pathologiques associées à HHV-8 sont exprimés à fois durant la phase de latence et lytique du virus. C'est ce rôle particulier de HHV-8 dans l'induction de la prolifération des lymphocytes B et des conséquences métaboliques qui s'ensuivent qui vont être ciblés dans cette dernière partie.

2. La prolifération des lymphocytes B infectés est associée à l'expression de la protéine d'HHV-8 LANA

La protéine virale de latence LANA est constitutivement exprimée dans les cellules infectées par HHV-8, et son expression régule la transcription de plusieurs facteurs de transcription avec des conséquences sur plusieurs voies de signalisation impliquées dans le cycle cellulaire. **Notch est une voie de signalisation** très conservée. Elle contrôle différents événements impliqués dans le développement, la prolifération et l'homéostasie tissulaire. Il a été montré que la dérégulation de cette voie de signalisation est fortement corrélée avec l'oncogenèse (Girard et al., 1996). Lan et al. montrent la présence d'une accumulation aberrante de la forme activée du domaine intracellulaire de Notch1 (intracellular domain, ICN) dans les cellules de PEL infectées de manière latente par HHV-8 et mettent en évidence que la protéine LANA est responsable de cette augmentation. Cette accumulation a pour conséquence une augmentation de la prolifération de ces cellules de PEL (Lan et al., 2006).

L'expression de la protéine de latence LANA est aussi associée à la dérégulation de l'expression des **kinases Pim**. Les kinases Pim (Pim-1,-2 et -3 ; Proviral Integration site for Moloney murine leukemia virus) sont une famille de sérine/thréonine kinases qui jouent un rôle fondamental dans les processus de survie, de prolifération ou de différenciation cellulaire. Ce sont des proto-oncogènes surexprimés dans de nombreuses lymphoproliférations tumorales B et en particulier dans le lymphome de Burkitt's associé à l'infection par EBV. Il a aussi été montré que ces kinases sont augmentées dans des lymphocytes B primaires infectés par HHV-8 (Gaidano and Dalla-Favera, 1993). *In vitro*, Bharat et al. montrent que LANA augmente l'expression de Pim-1 par son interaction avec son promoteur (pPim-1) dans des lignées de PEL. De plus, les cellules qui expriment la protéine virale LANA prolifèrent plus rapidement et sont plus résistantes à l'apoptose (Bajaj et al., 2006). Il est bien établi que la transition à travers les immune checkpoints du cycle cellulaire (Mochizuki et al., 1999) et les fonctions anti-apoptotiques sont associées à l'expression de Pim-1 (Aho et al., 2004; Yan et al., 2003), et de fait les résultats de Bharat et al. suggèrent que l'expression augmentée de Pim-1 dans les cellules infectées par HHV-8 exprimant LANA est responsable, du moins en partie, de cet effet.

La **Survivine appartient à la famille des IAP** (inhibitors of apoptosis proteins), et est exprimée par les cellules embryonnaires et par les cellules en prolifération. Plusieurs études montrent que c'est une protéine importante dans la régulation de la prolifération et viabilité cellulaire. La majorité des tumeurs, solides ou hématopoïétiques, l'exprime de façon aberrante

et la Survivine est identifiée comme étant le quatrième gène le plus fréquent et abondant dans les tumeurs (Altieri, 2001). Le promoteur du gène codant pour la Survivine contient le site de fixation des facteurs de transcription Sp1 et p53. Lu et al. montrent *in vitro* que l'activité du promoteur de la Survivine est augmentée par l'expression induite de la protéine virale de latence LANA dans la lignée HEK293 et ce de façon dose dépendante par rapport à l'expression de LANA (Lu et al., 2009). Ils montrent également que la protéine virale LANA forme un complexe avec la protéine Sp1 ou la protéine p53, et que ce complexe se fixe au promoteur de la Survivine. Ainsi la protéine virale LANA est donc capable d'augmenter l'expression de la Survivine et par conséquent d'induire la prolifération des lymphocytes B infectés par HHV-8 comparativement aux cellules non infectées (Lu et al., 2009).

Par ailleurs, dans une étude récente Jha et al. rapportent une expression augmentée de la protéine de polarité **PAR-3** (partitioning-defective protein) dans les lymphocytes B primaires infectés par HHV-8 et les lignées de PEL. L'équipe montre que Par-3 interagit avec la protéine virale LANA dans les lymphocytes B infectés par HHV-8 mais aussi dans les lignées cellulaires de PEL et que cette interaction conduit à la translocation de Par-3 de la périphérie cellulaire au noyau et à son interaction dans la signalisation cellulaire. De fait, l'invalidation du gène codant pour Par-3 a pour conséquence une réduction de prolifération des cellules et une augmentation de l'induction de l'apoptose. Enfin, la protéine LANA augmente l'expression des protéines Par-3 qui à son tour régule positivement l'expression de SNAIL dans les lymphocytes B infectés par HHV-8. De plus, SNAIL se fixe aussi à la région promotrice de p21 et peut réguler son activité, en augmentant la voie de signalisation NFκB (Jha et al., 2016), voie de signalisation majeure dans le développement de tumeurs associées à l'infection par HHV-8 (Keller et al., 2006)

Au total, ces études suggèrent que HHV-8 par son altération de différentes voies de signalisation est capable d'induire la prolifération des lymphocytes B qu'il infecte et l'expression de la protéine virale LANA est impliquée dans ce processus.

3. HHV-8 induit une altération du métabolisme cellulaire

L'altération du métabolisme cellulaire est fortement corrélée à des conditions pathologiques telles que les cancers ou les infections virales. Ces modifications concernent les trois voies métaboliques majeures : glycolyse, synthèse d'acide gras et glutaminolyse (Figure 7). Les oncogènes sont responsables des changements métaboliques dans les cellules cancéreuses qui contribuent à la prolifération soutenue de ces cellules, ainsi qu'au maintien de l'activité des

oncogènes. De même, quelques études récentes rapportent des interactions entre les protéines de latence du virus HHV-8 et la consommation de glucose et la production d'acides gras dans les lymphocytes B infectés. Par contre aucune donnée n'est encore disponible en ce qui concerne directement le métabolisme de la glutamine dans des lymphocytes B infectés par HHV-8. De telles données n'existent que dans des cellules endothéliales infectées par HHV-8 (Delgado et al., 2012), montrant l'importance de la glutamine pour la survie cellulaire et l'alimentation des voies de synthèse des acides gras.

a) HHV-8 active la glycolyse durant la latence

Le métabolisme du glucose des cellules cancéreuses décrit par Otto Warburg dans les années 1930 est devenu une marque spécifique associée au cancer, appelée « effet Warburg ». Les cellules cancéreuses puisent leur énergie essentiellement à partir du glucose à travers la glycolyse, afin de répondre à leurs besoins en énergie, mais également à leur besoin en biomasse nécessaire à leur division accrue.

Une inhibition induite chimiquement de la glycolyse induit l'apoptose des cellules endothéliales infectées par HHV-8 montrant l'importance de ce processus pour ces cellules infectées (Delgado et al., 2010). L'augmentation de l'expression d'une région contenant 10 des locus du virus codant pour des micro-ARNs d'HHV-8 est suffisante pour induire la glycolyse dans des cellules endothéliales (Yogev et al., 2014). Plus récemment, une glycolyse augmentée est également mise en évidence les lignées cellulaires B issues de PEL (Bhatt et al., 2012).

Ainsi, l'effet Warburg permet probablement aux cellules infectées de manière latente de survivre et de proliférer. Toutefois, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour démontrer que les gènes viraux d'HHV-8 sont responsables de l'induction de la glycolyse durant la latence dans les lymphocytes B.

b) HHV-8 active la synthèse d'acide gras pendant la latence

Le virus HHV-8 induit plusieurs autres changements métaboliques, incluant l'augmentation de la synthèse d'acide gras. Comme pour glycolyse, Delgado et al. montre que l'inhibition de la synthèse d'acide gras dans des cellules endothéliales infectées induit une augmentation de leur mort (Delgado et al., 2012). Le traitement par des inhibiteurs de la synthèse d'acides gras rend de lymphocytes B infectés par HHV-8 rend également ces cellules sensibles à la mort cellulaire, suggérant que la synthèse des acides gras est également nécessaire à la survie des lymphocytes B infectés (Bhatt et al., 2012). Les cellules de la lignée cellulaire du PEL

présentent comme pour la glycolyse un niveau très élevé de l'activité de synthèse des acides gras comparativement à des lymphocytes B primaires non infectés.

Au total, l'induction de la synthèse d'acide gras permet une rapide adaptation à l'environnement cellulaire prompt pour la croissance rapide des cellules infectées.

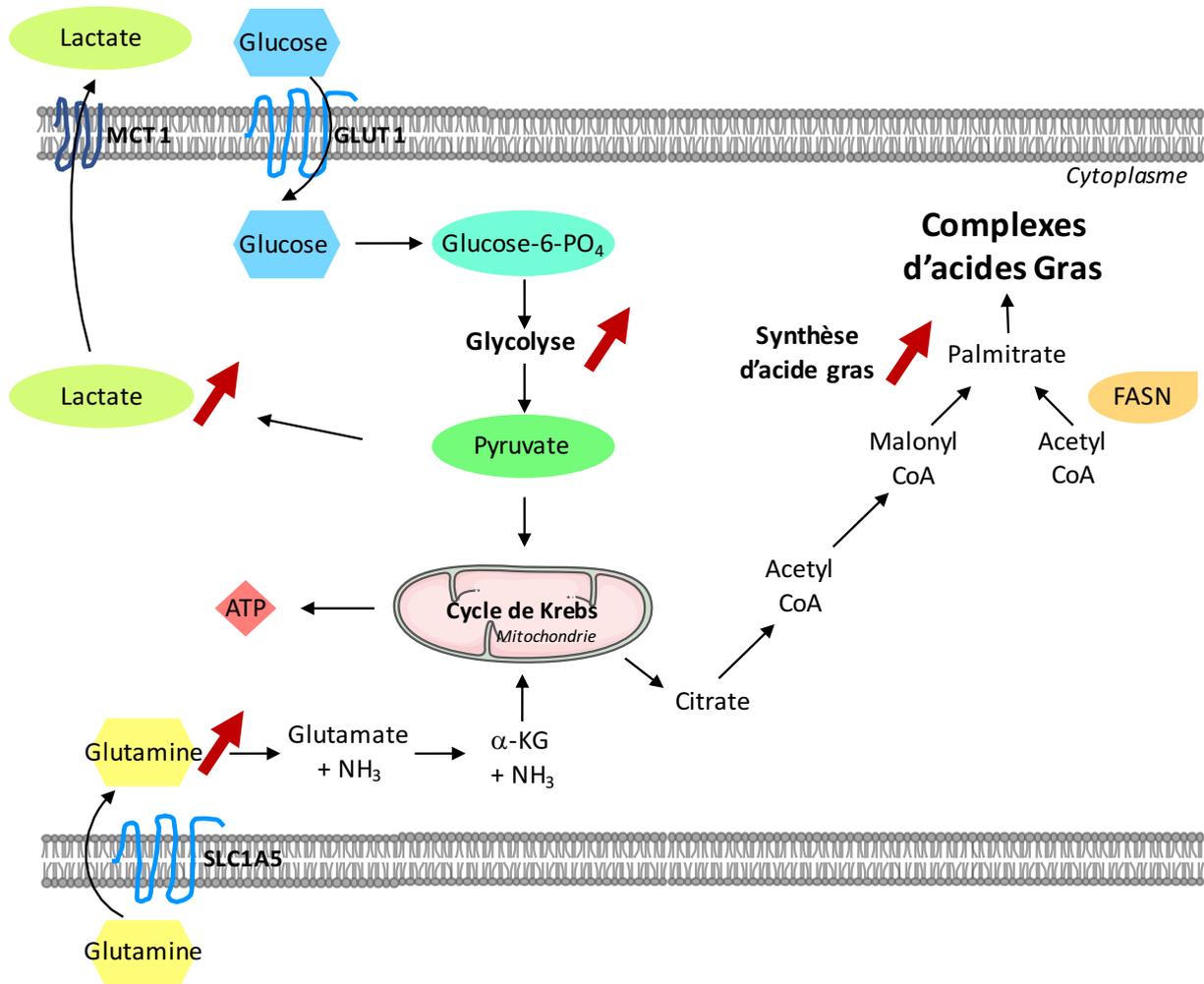


Figure 7. Illustration des trois voies métaboliques majeures : Glycolyse, synthèse et Glutaminolyse d'acide gras, et des altérations connues dans les lymphocytes B infectés par HHV-8. Une fois le glucose entré dans la cellule à travers des transporteurs tel que GLUT1, il est rapidement phosphorylé en Glc-6-phosphate, ce qui lui permet d'intégrer le cycle de la glycolyse. Le Pyruvate, le produit final de la glycolyse, est converti en lactate et il est sécrété par la cellule à travers des transporteurs, tel que MCT1. Le pyruvate peut être aussi oxydé par le cycle de Krebs et générer de l'ATP. Le citrate, un intermédiaire métabolique, peut quitter le cycle de Krebs et être transporté dans le cytoplasme, où il est transformé en acetyl-CoA qui est converti en malonyl-CoA. Acetyl- et malonyl-CoA sont combinés à l'aide d'une série de réactions par FASN, une multienzyme polypeptidique, pour former le palmitate, qui sera élongé ou dénaturé en acide gras. Ces acides gras pourront être utilisés pour la synthèse d'autres macromolécules et de lipides nécessaires à la division cellulaire. La glutamine entre dans les cellules et rejoint le cycle de Krebs. Au cours de la latence, les protéines du virus HHV-8 peuvent activer ces trois voies métaboliques (indiqué par une flèche rouge).

III. HHV-8 et le système immunitaire

A. Les réponses immunes mises en place contre HHV- 8

L'immunité joue un rôle majeur dans le contrôle de l'infection par HHV-8 comme l'en atteste la survenue du SK et de la MCM principalement chez des patients immunodéprimés (infectés par le VIH, transplantés, sujets âgés) (Boshoff and Weiss, 2002). Ceci suggère que la perte du contrôle immunitaire du virus peut conduire à une prolifération de cellules infectées par HHV-8 incontrôlée et au développement de pathologies associées à HHV-8. Inversement, chez les patients infectés par le VIH (Bihl et al., 2007a; Bourboulia et al., 2004) ou transplantés rénaux (Cattelan et al., 1999), des améliorations cliniques d'un SK peuvent être observées lorsque l'immunité est restaurée. Ainsi, le système immunitaire joue un rôle important dans le contrôle de l'infection par HHV-8, conduisant le virus à d'établir une infection latente persistante. L'établissement d'un tel équilibre avec le système immunitaire est une vraie caractéristique commune à tous les herpèsvirus.

1. Induction des réponses immunes innées

Les récepteurs TLR (Toll-like receptor) sont des récepteurs qui reconnaissent des motifs moléculaires présents uniquement chez les microorganismes pathogènes dénommés PAMP pour « pathogen-associated microbia pattern ». Cette reconnaissance induit l'activation de la voie de signalisation NFκB et la production d'IFN de type I et de cytokines pro-inflammatoires.

En primo-infection, HHV-8 est capable d'induire la stimulation de la voie de signalisation et l'augmentation de l'expression de TLR3 dans les monocytes et induit la production de cytokines spécifiques de cette voie dont l'IFN-β1 et CXCL10 (IP-10) (Gregory and Damania, 2009; West and Damania, 2008). Par contre, l'expression de TLR3 diminue lorsque la latence du virus est établie (Jacobs et al., 2013). Dans des modèles *in vitro*, les cellules qui présentent un déficit de l'expression de TLR4 sont plus susceptibles à l'infection (Lagos et al., 2008). Toujours, *in vitro* HHV-8 est capable d'activer les cellules dendritiques plasmacytoïdes et d'induire rapidement la production d'IFN-α via la voie de signalisation par le TLR9 (West et al., 2011). Ces données suggèrent, l'importance des réponses immunitaires induites par les

TLR dans un contexte de primo-infection par HHV-8 même si cette réponse est rapidement régulée négativement par le virus.

Par ailleurs, l'ADN double brin du virus HHV-8 active le récepteur intranucléaire IFI-16 (interferon gamma-inducible protein 16), membre de la famille des ALR (AIM2-like receptors), permettant ainsi la formation et l'activation de l'inflammasome et le déclenchement de la sécrétion d'IL1- β (Kerur et al., 2011; Singh et al., 2013).

2. Réponses Natural Killer

Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la défense immunitaire contre d'autres herpèsvirus comme par exemple HSV-2 dont les infections graves sont favorisées par un déficit en cellules NK circulantes (Dalloul et al., 2004) ou encore le CMV. La réponse cellulaire NK dirigée contre les cellules infectées par HHV-8 est favorisée par l'inhibition de l'expression des molécules du CMH de classe I par le virus lui-même (voir paragraphe III. B. 3.a).

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur les réponses NK. Une première observation rapporte un cas de SK classique évolué associé à une diminution significative de l'activité des cellules NK mesurée par cytotoxicité au chrome contre des cibles cellulaires K562 ou des lignées de PEL. (Sirianni et al., 2002). Les auteurs observent une restauration de l'activité NK après régression de la maladie après un an sous traitement par l'IFN- α . Une seconde étude, rapporte une altération du répertoire des récepteurs activateurs/inhibiteurs des cellules NK chez les sujets séropositifs pour HHV-8 (Dupuy et al., 2012). De plus, les patients ayant un SK ont une diminution des récepteurs NK activateurs NKG2D associée à une diminution des fonctions des cellules NK. Ces anomalies disparaissent avec la résolution du SK sous Antirétroviraux (ARV). Enfin, les cellules NK circulantes de 2 patients atteints du PEL ont une très faible activité lytique dirigée contre les cellules cibles K562 comparativement à ceux de donneurs sains (Sirianni et al., 2005; Suscovich et al., 2004).

L'ensemble de ces données suggère que les cellules NK pourraient avoir un rôle dans le contrôle de l'émergence de la maladie.

3. Réponses cellulaires T anti-HHV-8

a) Réponses cellulaires T CD4 anti-HHV-8

Samantha et al ont développé un modèle *in vitro* d'infection de lymphocytes B primaires présentant les mêmes caractéristiques que les cellules infectées de la MCM (IgM⁺/ λ ⁺). Ces

cellules infectées expriment l'ARNm LANA sans modulation de l'expression du CMH de classe II et peuvent donc être une cible potentielle des lymphocytes T CD4 spécifiques de l'antigène LANA. Les lymphocytes B infectés ont été mis en culture en présence de 6 clones T différents spécifiques de LANA générés *in vitro* par l'équipe et la reconnaissance de l'antigène LANA a été évaluée par la sécrétion d'IFN- γ . Les résultats montrent que les clones T sont capables de reconnaître les lymphocytes B infectés de manière efficace (Nicol et al., 2016). Ces résultats suggèrent que l'antigène LANA est bien présenté pour une reconnaissance efficace par les lymphocytes T CD4. Une autre étude a montré que des cellules T CD4 oropharyngées activées pouvaient reconnaître de façon non restreinte par le CMH des ligands non identifiés à la surface de cellules B infectées par HHV-8 (Myoung and Ganem, 2011).

Peu de données *ex vivo* sont disponibles sur la réponse T CD4 anti-HHV-8. Dans une première étude, les réponses spécifiques d'antigènes de la phase de latence (LANA/ORF73) et de la phase lytique (ORF57) ont été caractérisées par marquage intracellulaire de cytokines dans les PBMCs de 11 patients VIH+ HHV-8+ asymptomatiques pour HHV-8. Seul deux patients testés sur les 11 présentaient une réponse T CD4 spécifique, mais qui restait très faible (Bihl et al., 2007b). Dans une étude plus récente utilisant des cellules mononucléées du sang périphérique de donneurs sains séropositif pour HHV-8, les auteurs mettent en évidence une faible réponse T CD4 anti-HHV-8 *ex vivo* dirigée contre des antigènes de latence LANA, v-FLIP, v-Cyclin et Kaposines (Sabbah et al., 2012).

Encore moins de données sont disponibles sur les réponses T CD4 anti-HHV-8 analysées chez les patients présentant une pathologie tumorale liée à ce virus. Cependant, dans un petit groupe de patients VIH+ ou VIH- atteints de KS, MCM ou PEL, des réponses T CD4 dirigées contre des antigènes de la phase lytique ont pu être détectées, mais une fois encore ces réponses restent faibles (Robey et al., 2009). Plusieurs équipes montrent par contre que la reconstitution du nombre de cellules T CD4 chez ces patients peut être associée à une régression tumorale (Bihl et al., 2007a) ou une infection asymptomatique (Guihot et al., 2006; Lambert et al., 2006; Wang et al., 2001). Ceci suggère un rôle de la réponse immune adaptative et en particulier les réponses T CD4, dans le contrôle de l'infection par HHV-8. Cependant, des données récentes rapportant une augmentation de l'incidence de la MCM liée à HHV-8 parmi les patients VIH avec une réplication virale contrôlée et un taux de cellules T CD4 normal (Powles et al., 2009) suggèrent que cette pathologie en particulier ne serait pas uniquement le résultat d'un déficit majeur en cellules CD4.

b) Réponses cellulaires T CD8 anti-HHV-8

La première évidence de la présence de CTL anti-HHV-8 chez des sujets séropositifs pour HHV-8 et asymptomatiques a été réalisé à l'aide de tests de cytotoxicité au chrome et a été publiée en 1999. Les cellules cibles exprimaient soit la protéine lytique K1, soit la protéine lytique K8.1, soit la protéine de latence K12 de HHV-8 après infection par des vaccins recombinants pour ces protéines et des CTL spécifiques de ces 3 protéines ont été détectées après co-culture *in vitro* de plusieurs jours (Osman et al., 1999).

Contrairement à la primo-infection par EBV qui est responsable de la survenue de mononucléoses infectieuses chez le jeune adulte, la primo-infection par HHV-8 n'est pas spécifiquement associée à une symptomatologie particulière chez le sujet sain. La mise en place de la réponse T CD8⁺ au cours de la primo-infection a été étudiée par quelques auteurs. Au cours d'une étude longitudinale, sur 108 patients séronégatifs pour le VIH qui présentaient des risques d'infection par HHV-8, une séroconversion pour HHV-8 a été détectée chez 5 de ces patients (Wang et al., 2001). Les auteurs de l'étude ont dans un premier temps analysé le phénotype global des lymphocytes T autour de la période de séroconversion. Contrairement à ce qui est observé lors de la primo-infection par EBV (Callan et al., 1996; Lynne et al., 1998), aucune activation des cellules T CD8 ou CD4 n'est observée au moment de la primo-infection par HHV-8. De plus, aucune modification dans l'expression des marqueurs CD45RA, CD45RO et de co-stimulation CD28 n'est rapportée. Les auteurs ont tout de même détecté chez les 5 patients des réponses T CD8 anti-HHV-8 dirigées contre un large spectre de gènes (précoces immédiats, précoces et tardifs) sans aucune cible dominante. L'analyse des lymphocytes T CD8 anti-HHV-8, montre une augmentation de fréquence jusqu'à atteindre un maximum de 2 ans après la primo-infection, suivie d'une diminution de cette fréquence qui corrèle avec la diminution du titre d'anticorps, et qui est probablement due à la diminution de la réplication virale et de la présentation d'antigènes viraux. Une seconde étude s'est intéressée, entre autres, à deux patients greffés rénaux séronégatifs pour HHV8 dont le statut du donneur était séropositif pour HHV8. Les deux receveurs ont présenté une séroconversion pour HHV-8 mais n'ont pas présenté de charge virale HHV-8 détectable pendant 24 et 11 mois après la transplantation. Chez un des greffés rénal présentant le même HLA que le donneur, des lymphocytes T CD8 spécifiques d'antigènes de protéines des phases latente et lytique ont pu être détectées. Par ailleurs, cette étude a mis en évidence dans ce contexte une polarisation des cellules T CD8⁺ vers un phénotype fortement différencié CD45RA⁺ CCR7⁻

ou CD45RA⁺ CD27⁻ avec une expression de la perforine indiquant un caractère effecteur de ces cellules et leur capacité à contrôler l'infection par HHV-8 (Lambert et al., 2006).

L'ensemble de ces données, montrent que la réponse T CD8 en primo-infection contre le virus HHV-8 est à large spectre antigénique, sans immunodominance mise en évidence, corrélée à la réplication virale, et beaucoup plus faible que celle observée au cours de la primo-infection par l'EBV.

Au cours de l'infection chronique asymptomatique, les réponses T CD8 anti-HHV-8 sont détectées avec répertoire antigénique large et des fréquences qui restent plus faibles que celles observées lors de l'infection asymptomatique par EBV en phase chronique (Barozzi et al., 2008; Guihot et al., 2006; Lambert et al., 2006). Très peu de données sont disponibles sur le caractère fonctionnel de cette réponse T CD8 spécifique. Une étude, rapporte à la fois des réponses T CD8 anti-HHV-8 mono- et polyfonctionnelles (sécrétions d'au moins deux protéines effectrices, IFN- γ , IL2, TNF- α , MIP1- β , ou CD107a), dirigées contre un nombre important d'épitopes (Lepone et al., 2010). Enfin, Bihl et al. montrent chez des patients infectés par le VIH et HHV-8 mais asymptomatiques que les cellules T CD8 dirigées contre des antigènes lytiques et latents de HHV-8 ont un profil polyfonctionnel et de différenciation mémoire similaires à celui observé lors d'une infection chronique par l'EBV suggérant leur caractère protecteur (Bihl et al., 2007b).

Chez les patients présentant un SK, les réponses T CD8 anti-HHV-8 sont détectées avec une fréquence plus faible et avec une diversité plus limitée de leur répertoire antigénique comparativement aux patients en infection asymptomatique (Barozzi et al., 2008; Guihot et al., 2006; Lambert et al., 2006). De plus, une étude utilisant un marquage par tétramère des cellules T CD8 spécifiques pour HHV-8 a pu confirmer ces observations et rapporte également une diminution de la capacité des cellules CD8 spécifiques à sécréter de la perforine (Lambert et al., 2006). Au cours de la guérison du SK dans un contexte de co-infection par le VIH, après traitement par chimiothérapie et antirétroviraux ou antirétroviraux seuls, on observe à l'aide de tests Elispot IFN- γ , une amélioration des réponses T CD8 spécifiques, même si ces réponses restent faibles (Bihl et al., 2007a). Ces résultats tendent à être confirmés chez les patients greffés rénaux, où la détection des cellules T CD8 spécifiques correspond aux épisodes de rémission clinique du SK.

Une seule étude a analysé la présence de réponses T CD8 spécifiques chez des patients MCM. Cette étude montre la présence chez la moitié des patients inclus dans l'étude la présence de cellules T CD8 anti-HHV-8 polyfonctionnelles dirigées contre des peptides de protéines lytiques et latentes (Guihot et al., 2008). Par conséquent, la MCM ne semble pas associée à un

défaut de la réponse des cellules T CD8 spécifiques. Cependant, ces réponses polyfonctionnelles sont très faibles surtout dans le contexte de répllication forte de HHV-8 associée à la MCM et sont incapables de contrôler l'apparition d'une MCM ce qui pourrait suggérer l'existence de dérégulation immunes plus fines.

Ces données suggèrent un rôle protecteur de l'immunité cellulaire T CD8 spécifique du virus dans le contrôle clinique de l'émergence du SK associé à l'infection par HHV-8, mais ces réponses ne semblent pas être aussi protectrices dans le développement de la MCM.

B. HHV-8 et échappement immunitaire

Le système immunitaire humain est conçu pour reconnaître les pathogènes afin de déclencher des réponses immunes innées et adaptatives pour éliminer l'infection. Comme les autres virus responsables d'infections chroniques, HHV-8 possède de nombreux mécanismes d'échappement à l'immunité innée et adaptative afin de maintenir une infection à long terme chez son hôte. La latence virale par elle-même, au cours de laquelle seules quelques protéines sont exprimées pour limiter le nombre d'antigènes viraux présentés, est un mécanisme d'échappement aux réponses immunes. À côté de ce processus, sur les 90 gènes du génome du virus, au moins 22 sont potentiellement impliqués dans l'échappement au système immunitaire et permettent de favoriser l'établissement de l'infection et la dissémination chez l'hôte. La majorité de ces gènes s'expriment donc au cours de la phase répllicative de l'infection.

1. La latence virale comme mécanisme d'échappement

Pendant la phase de latence, le virus exprime un nombre limité de protéines virales, ce qui va considérablement limiter la présentation d'antigènes viraux par les cellules infectées. L'établissement de la latence dans les lymphocytes B est un vrai défi pour le virus qui, pour éviter que son génome ne soit complètement dilué et perdu pendant la division cellulaire de la cellule hôte, doit se répliquer avant que la cellule ne se divise et ne se ségrégue durant la mitose. La protéine majeure de latence **LANA** est essentielle au maintien du génome viral pendant la mitose cellulaire (Ballestas et al., 1999) (voir paragraphe I. C. 1. a). De plus, son interaction avec le promoteur de RTA permet d'inhiber son expression et ainsi empêcher la réactivation virale (Lan et al., 2005). Cependant, son expression peut être coûteuse pour le virus, car cette très longue protéine peut être une source de nombreux épitopes présentés par les molécules du CMH de classe I. De façon intéressante, la protéine LANA est capable

d'inhiber sa propre prise en charge et dégradation par le protéasome. Ce mécanisme tout à fait remarquable permet donc à cette protéine indispensable au virus d'échapper à l'apprêtement et à la présentation de ses différents épitopes aux lymphocytes T CD8⁺ (Zaldumbide et al., 2007).

Il a été récemment montré que le virus HHV- 8 ainsi que d'autre γ -herpèsvirus, sont capable d'exprimer des micro-ARNs (miRs) durant la phase de latence (Pfeffer et al., 2005; Samols et al., 2005; Sullivan et al., 2006). Comme ces micro-ARNs ne codent pas pour des protéines, ils ne peuvent pas être ciblés par le système immunitaire. Plusieurs de ces miRs vont participer au maintien de la latence dans la cellule infectée par HHV-8 en inhibant l'action de la molécule transactivatrice de la phase lytique RTA. Ainsi, miR-K9 interagit directement avec l'ARNm de ORF50/RTA pour empêcher la réactivation lytique (Bellare and Ganem, 2009) et miR-K12-5 peut aussi inhiber indirectement le transcrit de RTA (Lu et al., 2010). Enfin, miR-K12-4 peut cibler Rbl2 pour maintenir la latence de manière épigénique (Lu et al., 2010).

2. Échappement à la réponse immune innée

Une grande proportion du génome de HHV-8 est consacrée à l'échappement à la réponse immune innée de l'hôte. La majorité des fonctions de l'immunité innée est ciblée négativement par ces protéines virales avec la production d'IFN de type I, l'activation du complément, l'activation de l'inflammasome, l'activité des chémokines et l'activité des cellules NK.

a) Échappement à la reconnaissance par les PRR

Les TLR (toll like receptor) sont des PRR (pattern recognition receptor) qui reconnaissent les pathogènes. L'activation des TLR permet la production de cytokines et de chémokines antimicrobiennes à travers la signalisation de plusieurs facteurs de transcriptions incluant NF κ B, IRF et TRAF. L'infection in vitro de cellules endothéliales par HHV-8 induit une diminution de l'expression de TLR 4 en partie par l'action de v-GPCR et de v-IRF1 avec pour conséquence la suppression de la production de TFN- α , IL1- β , IL6 et IFN- β (Lagos et al., 2008). Il a été démontré par ailleurs que l'activité ubiquitine ligase de la protéine virale RTA peut causer la dégradation de la molécule adaptatrice de signalisation TRIF dont le rôle est important pour la production d'IFN- β via l'activation des TLR 3 et TLR 4 (Ahmad et al., 2011). Enfin, les micro-ARNs, miR-K12-9 et miR-K12-5 ont pour cible IRAK1 et MYD88,

qui sont tous les 2 des composants essentiels de la voie de signalisation des TLR et du récepteur de l'IL1 (Abend et al., 2012).

En plus des TLR, les cellules hôtes expriment aussi des récepteurs cytosoliques : RIG-1, MDA 5 et la famille de protéines NLR. RIG-1 détecte l'ARN viral et devient ubiquitinilé par TRIM 25, ce qui lui permet d'interagir avec le complexe de signalisation MAVS/IPS-1 (Gack et al., 2007; Kawai et al., 2005). L'activation de ce complexe conduit à l'induction d'IFN de type I. HHV-8 code pour une de-ubiquitine, la protéine virale codée par le gène ORF64, qui est capable de de-ubiquitiner RIG-1 et d'inhiber l'activation du promoteur de l'IFN- β via RIG-1 (Inn et al., 2011). Les NLR détectent une variété de ligand microbiens, et leur activation résulte dans la formation du complexe de l'inflammasome, qui active la caspase 1 et permet de générer la forme mature de IL1- β et de IL18 (Martinon et al., 2002). La production de IL1- β et d'IL18 en réponse à une infection conduit à la pyroptose. La protéine virale codée par le gène ORF63 possède des homologies avec la protéine cellulaire NLRP1 qui est un composant de l'inflammasome, mais elle ne possède pas le domaine d'activation et de recrutement de la Caspase-1, important pour la formation et la fonction de l'inflammasome. La protéine virale codée par le gène ORF63 est donc capable d'interagir avec NLRP1 pour prévenir la formation de l'inflammasome (Gregory et al., 2011).

b) Modulation de la voie de signalisation des Interférons de type I

Le virus HHV-8 emploie de multiples mécanismes à la fois pour inhiber la production et la signalisation des Interférons de type I (IFNs I). HHV-8 code pour 4 homologues des IRF (interferon regulatory factors) cellulaires appelés v-IRF 1 à 4 (Jacobs and Damania, 2011). Les IRF cellulaires sont une famille de facteurs de transcription qui entre autres conduisent à l'expression des IFNs I. Parmi ces 4 v-IRF, seuls v-IRF 1, 2 et 3 interfèrent avec la signalisation des IFNs I en interagissant avec les différents IRF cellulaires (Jacobs and Damania, 2011). De plus, v-IRF 1 et 2 sont capables de d'inhiber l'expression de l'IFN- β qui suit l'activation du TLR3 (Jacobs et al., 2013).

Il existe plusieurs autres protéines virales qui peuvent réduire la réponse IFN de type I. Il a été démontré que la protéine codée par ORF45 du virus entre en compétition avec IRF7 pour sa phosphorylation par les kinases IKK ϵ et TBK1, réduisant le niveau total de phosphorylation (Sathish et al., 2011) et son accumulation dans le noyau, et de fait la transcription de l'IFN de type I (Zhu et al., 2002). La protéine virale RTA peut aussi agir comme une ubiquitine ligase

E3 et induire l'ubiquitinylation et la dégradation de IRF7 avec pour conséquence la réduction de la transcription des gènes des IFN de type I (Yu et al., 2005).

Au total, HHV-8 utilise une variété de mécanismes pour échapper à l'activation de l'IFN, suggérant ainsi l'importance de l'échappement à ces réponses antivirales pour sa persistance dans les cellules hôtes.

c) Modulation de la voie de signalisation des chémokines et du complément

Le virus HHV-8 code pour 3 homologues des chémokines : v-CCL1 (v-CCL1, ou v-MIP 1), v-CCL2 (ou v-MIP 2) et v-CCL3 (ou v-MIP 3) (Guo et al., 1997). La protéine v-CCL1 est un ligand agoniste du récepteur de chémokine CCR- 8 (Endres et al., 1999), alors que v-CCL2 est un ligand qui bloque la signalisation à travers plusieurs récepteurs de chémokines (CCR-1, CCR-2, CCR-5, CCR-8, CXCR-1, CXCR-2, et CXCR-4) (Dairaghi et al., 1999). Enfin, v-CCL3 est un ligand agoniste de CCR-4 (Stine et al., 2000). Au total, l'interaction des chémokines virales avec leurs récepteurs cellulaires induit une polarisation de la réponse immune vers la voie Th2 moins favorable à la lyse des cellules infectées par HHV-8 (Stine et al., 2000; Weber et al., 2001).

Le système du complément fait partie de la réponse immune innée. Il intervient dans la destruction des agents infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, mais aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques. Comme un grand nombre de virus, HHV-8 a développé des stratégies qui interfèrent avec le système du complément, en produisant des molécules qui bloquent différentes étapes de son activation. La protéine virale codée par le gène ORF4 du virus HHV-8 donne par épissage alternatif trois isoformes de la protéine lytique KCP (KSHV complement proteins) (Mark et al., 2004; Spiller et al., 2003b). Tous ces isoformes sont des protéines transmembranaires qui présentent 4 domaines caractéristiques des membres de la famille CCP (complement control protein), qui sont exprimées à la surface des cellules infectées et exercent une activité de régulation du complément portant à la fois sur la voie classique et sur la voie alterne.

Les protéines KCP sont exprimés durant la phase de latence de l'infection et sont détectés à la surface des cellules infectées de PEL (Spiller et al., 2003b) ou de cellules endothéliales infectées après induction de la réplication lytique du virus (Spiller et al., 2006). Les KCPs peuvent réguler le système du complément en neutralisant ou en accélérant la dégradation de

la C3 convertase qui a été activée par la voie classique du complément (Mark et al., 2004; Mark et al., 2008). La capacité d'interaction des KCPs avec de la voie alterne est modeste, indiquant que cette voie ne possède qu'un rôle limité dans la clearance du virus *in vivo* (Spiller et al., 2003a). Par ailleurs, les KPCs peuvent agir comme des cofacteurs pouvant inactiver les molécules opsonisantes C3b et C4b (Spiller et al., 2003a).

d) Échappement aux réponses des cellules Natural Killer

Les cellules Natural Killer (NK) font partie de la première ligne de défense de l'organisme. Elles sont capables de reconnaître et de lyser rapidement et sélectivement les cellules infectées par un virus tout en sécrétant des cytokines, telles que IFN- γ et le TNF- α , qui stimulent et orientent la réponse adaptative. L'activité des cellules NK est finement régulée par intégration de la somme des signaux activateurs et inhibiteurs transmis par leurs récepteurs inhibiteurs ou activateurs, lors de leur interaction avec une cellule cible. Les récepteurs inhibiteurs les plus étudiés reconnaissent les molécules du CMH de classe I du soi exprimées à la surface de quasiment toutes les cellules saines. En situation normale, les cellules NK « voient » le CMH de classe I sur les cellules saines et leur fonction est inhibée. Ce mécanisme garantit la préservation des cellules saines de la cytotoxicité des NK. Une baisse d'expression des molécules du CMH de classe I est perçue comme une modification de l'équilibre des signaux inhibiteurs/activateurs, et conduit à l'activation des fonctions effectrices NK par les récepteurs activateurs. Les récepteurs activateurs incluent les récepteurs de la famille NCR (Natural cytotoxicity receptor) (NKp30, NKp44, NKp46 et NKp80), le récepteur CD94/NKG2D, le récepteur 2B4/CD244 appartenant à la sous-famille CD2 et le récepteur CD16 qui reconnaît préférentiellement les sous-classes d'immunoglobulines (Ig) IgG1 et IgG3. L'engagement de ces récepteurs activateurs a pour conséquence le déclenchement de la cytotoxicité naturelle et de l'ADCC par les cellules NK. L'engagement du récepteur NKG2D avec les molécules de stress MIC-A et MIC-B, et des molécules qui présentent des analogies de structures avec les CMH de classe I, joue un rôle important dans l'immunité innée.

Les protéines virales MIR 1 et MIR 2, codées respectivement par les gènes K3 et K5, provoquent une diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I à la surface cellulaire (Ishido et al., 2000) (voir paragraphe III. B. 3. a). L'expression de MIR1 ou la co-expression de MIR 1/2 confère de plus aux cellules une résistance à la lyse exercée par les cellules NK. MIR 2 peut également diminuer l'expression membranaire des molécules de co-

stimulation B7.2 (CD86, ligand de CD28) et ICAM-1 (CD54, ligand de LFA-1) sur les lymphocytes B (Coscoy and Ganem, 2001). Cet effet résulte d'une accélération de l'endocytose de ces molécules à partir de la surface cellulaire. En diminuant l'expression membranaire de ICAM-1, HHV- 8 parvient à réduire la capacité des cellules NK à maintenir un contact stable avec la cellule cible, avec pour conséquence la diminution de la probabilité qu'un signal positif soit transmis aux cellules NK. En diminuant de l'expression membranaire des molécules CMH de classe I, B7.2 et ICAM-1, les MIR 1 et MIR 2, pourrait favoriser l'échappement des cellules infectées à la réponse cytotoxique NK. Par ailleurs, MIR 2 diminue l'expression de MICA et d'AICL (activation-induced C-type lectin), deux ligands des récepteurs activateurs des cellules NK, NKG2D et NKp80 respectivement. Ainsi, MIR 2 supprime la capacité des cellules NK à lyser les cellules infectées en empêchant la transmission de signal activateur à ces cellules (Thomas et al., 2008). Enfin, MIR 1 et MIR2 peuvent inhiber l'effet de la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK activées, en diminuant l'expression du récepteur à l'IFN- γ (IFN- γ -R1) (Li et al., 2007).

3. Échappement à la réponse immune adaptative

a) Modulation de la présentation antigénique

L'immunité adaptative, et plus particulièrement les lymphocytes T cytotoxiques, est un élément essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections virales. Les protéines virales endogènes sont dégradées en peptides par la voie du protéasome et sont transportés dans le réticulum endoplasmique par les transporteurs TAP-1 et TAP-2 (transporter associated antigen protein). La présentation de ces peptides aux CTL dépend de la formation du complexe peptide-CMH-I dans le réticulum endoplasmique. Ce complexe migre vers la surface de la cellule via l'appareil de Golgi pour être exprimé à la surface cellulaire.

Afin de se prémunir contre la reconnaissance par les cellules T ou de la retarder, plusieurs gènes du virus sont capables de réduire l'expression des molécules du CMH de classe I. Le virus HHV-8 exprime 2 protéines virales modulatrices MIR 1 et MIR 2 (ou respectivement K3 et K5) qui régulent négativement l'expression de la molécule du CMH de classe I à la surface des cellules infectées. Ces deux protéines sont exprimées de manière précoce dans les cellules isolées de patients avec un PEL (Jenner et al., 2001), mais aussi dans les lymphocytes B infectés de manière latente (Taylor et al., 2005). De plus, les cellules endothéliales humaines immortalisées expriment faiblement la molécule du CMH de classe I comparativement aux contrôles (Tomescu et al., 2003). Les protéines modulatrices MIR 1/2

interagissent avec le domaine transmembranaire de la molécule du CMH de classe I. Cette interaction va avoir pour conséquence l'ubiquitinylation du domaine intra-cytoplasmique de la molécule du CMH-I. La molécule ubiquitinylée va être reconnue par la machinerie d'endocytose et délivrée au lysosome ou elle sera dégradée. La protéine modulatrice MIR 1 régule négativement l'expression de toutes les molécules du CMH de classe I (HLA-1, HLA-B, HLA-C, HLA-E), alors que la protéine modulatrice MIR 2 régule négativement uniquement l'expression de HLA-A et HLA-B (Ishido et al., 2000). Il est intéressant de noter que MIR 2 n'affecte pas l'expression des molécules présentatrices HLA-C et HLA-E qui sont les ligands dominants des récepteurs inhibiteurs des cellules NK. Cette modulation par MIR 2 aboutit donc à un échappement à la reconnaissance par les CTL sans augmenter l'activation des cellules NK tueuses sans que la relevance biologique de ce phénomène n'ait été démontrée *in vivo*. Par ailleurs la protéine virale v-IRF1 à travers son interaction avec le facteur de transcription p300 prévient la transcription basale de la molécule du CMH-I (Lagos et al., 2007).

La molécule CD1d, qui présente les antigènes lipidiques aux cellules iNKT, est également la cible d'une régulation négative par les protéines virales modulatrices MIR 1 et MIR 2 pendant la phase lytique de l'infection virale. Ces protéines virales augmentent l'endocytose du CD1d membranaire sans en augmenter la dégradation lysosomale. Dans un modèle *in vitro*, l'expression de K5 dans la lignée cellulaire BJAB (lymphome de Burkitt B) inhibe l'activation des cellules iNKT (Sanchez et al., 2005).

b) Modulation de la co-stimulation des lymphocytes T

La génération d'une réponse immunitaire efficace requière l'engagement des lymphocytes T avec les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages ou les lymphocytes B). L'interaction des molécules CD80 et CD86 exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigènes avec les molécules CD28 et CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4) exprimées à la surface des lymphocytes T est essentielle à ce processus. L'interaction entre les molécules d'adhésion ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et LFA-1 (lymphocyte function-associated antigen 1) est aussi essentielle à la co-stimulation. Plusieurs études montrent que la protéine modulatrice MIR 2 peut moduler la fonction co-stimulatrice des cellules présentatrices d'antigènes en interagissant avec l'expression de ces molécules (Coscoy and Ganem, 2001; Gregory et al., 2012). En effet, MIR 2 inhibe l'expression des molécules CD86 et ICAM-1 dans toutes les lignées cellulaires

étudiées en favorisant l'ubiquitinylation et la dégradation de ses propres protéines par la voie lysosomiale. Les lymphocytes B étant les principales cellules cibles du virus HHV-8, cette régulation négative du signal de co-stimulation va permettre d'induire une altération de la capacité des lymphocytes B à induire l'activation des lymphocytes T.

c) Modulation des réponses immune Th1

Le gène ORF K4 du virus HHV-8 code pour la protéine virale v-CD200, une glycoprotéine membranaire qui partage 40% d'analogie de séquence avec la glycoprotéine CD200 cellulaire. Les lymphocytes T, les lymphocytes B, les cellules épithéliales, les cellules endothéliales et certaines de cellules de la lignée myéloïde (cellules dendritiques et macrophages) expriment la glycoprotéine CD200. L'expression de son récepteur CD200R est plus restreinte aux cellules myéloïdes comme les macrophages, les cellules dendritiques et les mastocytes. Il a été montré *in vitro* que v-CD200 se lie directement au récepteur CD200R avec une affinité similaire à celle du CD200 cellulaire. Cette interaction engendre un signal inhibiteur unidirectionnel dans la cellule exprimant ce récepteur qui réduit ainsi l'activation des cellules myéloïdes avec une diminution de leur production de cytokines Th1 (Foster-Cuevas et al., 2004). Ces résultats suggèrent que v-CD200 peut contribuer à une modulation immunitaire favorable à la persistance virale.

En plus d'inhiber les réponses IFN de type I, HHV-8 peut aussi réprimer la voie de signalisation de l'IFN- γ . Les protéines virales K3 et K5 sont en effet capables d'induire la dégradation du récepteur à l'IFN- γ , qui normalement induit l'activation de la voie de signalisation JAK/STAT (Li et al., 2007). La signalisation à travers cette voie est de fait fortement diminué et par conséquent l'immunité cellulaire qui lui est associé et dont le rôle est majeur dans l'immunité anti-virale.

Enfin, plus indirectement le virus va résister à la réponse cellulaire cytotoxique. En effet, v-FLIP analogue de FLICE, est également exprimé pendant la phase de latence. Cette protéine a un effet anti-apoptotique qui passe par une interaction avec les voies du récepteur de mort cellulaire CD95 lorsqu'elle est transférée dans des lignées lymphocytaires T. Son expression pourrait ainsi conférer à la cellule infectée une résistance contre la lyse par les lymphocytes T cytotoxiques (Djerbi et al., 1999).

IV. Les lymphocytes T Natural Killer invariants (iNKT)

A. Caractéristiques générales des cellules iNKT

Les cellules iNKT sont des cellules T non conventionnelles qui partagent certaines caractéristiques des lymphocytes T conventionnels mais qui fonctionnent comme des cellules innées avec des propriétés régulatrices ou cytotoxiques directes. Elles reconnaissent par leur TCR invariant (iTCR), qui exprime une chaîne α invariante du TCR V α 24-J α 18 (V α 14-J α 18 chez la souris) en combinaison avec la chaîne β du TCR V β 11 (V β 8.2, 7 ou V β 2 chez la souris), des antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d à la surface des cellules présentatrices d'antigènes. Ces cellules NKT invariantes sont aussi appelées cellules NKT de type 1 ou iNKT. Elles diffèrent des cellules NKT de type II (restreintes par la molécule CD1d et reconnaissant des glycolipides) et des cellules NKT de type III (non restreintes par la molécule CD1d et reconnaissant des lipides endogènes) qui expriment des chaînes V α du TCR plus diversifiées (Brennan et al., 2013).

1. La molécule CD1d

CD1d est une molécule transmembranaire non polymorphique non classique du CMH de classe I-like, appartenant à une large famille comprenant également CD1a, CD1b et CD1c qui partagent une similitude de structure et un rôle de présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les cellules iNKT reconnaissent les antigènes présentés par la molécules CD1d (Bendelac et al., 1995) qui est exprimée par plusieurs cellules d'origine hématopoïétique: les cellules dendritiques, les macrophages, les granulocytes et les lymphocytes B, dont les lymphocytes B de la zone marginale qui sont ceux qui l'expriment le plus fortement (Roark et al., 1998). La molécule CD1d est aussi exprimée par les thymocytes qui interviennent pendant le processus de sélection positive des cellules iNKT (voir paragraphe IV.A.2.a) (Forestier et al., 2003). Elle est synthétisée dans le réticulum endoplasmique où elle s'associe à une protéine de transfert qui aide probablement au chargement d'un lipide endogène avant l'export à la surface cellulaire (18,19). Une fois à la surface, la molécule CD1d est recyclée à travers le système endolysosomal où elle interagit avec des protéines du lysosome comme les saposines, qui permettent le chargement d'antigènes exogènes au sein de la molécule de CD1d (Cohen et al., 2009; Jayawardena-Wolf and Bendelac, 2001).

La molécule CD1d présente à la fois les antigènes lipidiques dérivés des pathogènes et des lipides du soi. De multiples antigènes lipidiques naturels capables de stimuler une réponse des cellules iNKT ont été identifiés. L' α -GalCer est un glycolipide dérivant d'une éponge marine qui est le premier agoniste exogène des cellules iNKT à avoir été identifié. Aujourd'hui dans la plupart des études de l' α -GalCer synthétique est utilisé pour stimuler une réponse des cellules iNKT *in vitro* et également *in vivo* (Kawano et al., 1997).

2. Développement, sélection thymique et maturation des cellules iNKT

Les cellules iNKT et les lymphocytes T conventionnels partagent le même précurseur au sein du thymus : les lymphocytes pro-T double négatifs (DN, CD4⁻/CD8⁻). Les cellules iNKT subissent dans un premier temps un réarrangement aléatoire des chaînes β pour α de leur TCR. Ces thymocytes deviennent TCR⁺ (V α 24-J α 18 chez l'Homme et V α 14-J α 18 chez la souris) et double positives (DP, CD4⁺/CD8⁺). La formation du TCR est un élément clé dans le développement et la sélection des cellules iNKT. Les souris déficientes pour les protéines de recombinaison RAG1 et RAG2 ou les souris déficientes pour le gène J α 18 du TCR sont dépourvues de cellules iNKT. Après recombinaison de leur TCR, comme les lymphocytes T conventionnels, les cellules iNKT subissent une sélection positive et une sélection négative au niveau thymique. La molécule CD1d est importante dans ce processus puisque des souris CD1d^{-/-} sont elle aussi dépourvues de cellules iNKT (Bendelac et al., 1995; Wei et al., 2005). La maturation intrathymique des cellules iNKT donne naissance à deux populations de cellules iNKT chez la souris, CD4⁺ et CD4⁻ CD8⁻. Une population minoritaire CD4⁻CD8⁺ est en plus présente chez l'homme.

a) Sélections thymiques des cellules iNKT

La **sélection positive** des précurseurs des cellules iNKT a lieu dans le thymus et requière la reconnaissance du complexe « lipide du soi-CD1d » par leur iTTCR (Bendelac et al., 2007; Wei et al., 2005). La molécule CD1d est exprimée sur les thymocytes corticaux DP afin de réaliser la sélection positive (Figure 8). Cependant, les lipides endogènes candidats pour cette sélection restent mal connus (Bendelac et al., 2007).

La **sélection négative** durant le développement des lymphocytes T permet l'élimination des lymphocytes auto-réactifs, ce qui présente un mécanisme important pour prévenir les maladies auto-immunes. Les cellules iNKT ayant une auto-réactivité importante sont éliminées. Deux études ont permis de mettre en évidence la présence et le stade de cette

sélection négative thymique dans des modèles murins. Un traitement par l' α -GalCer de façon précoce, c'est-à-dire 3 jours après la naissance de la souris, induit une inhibition du développement des cellules iNKT (Pellicci et al., 2003). De plus, la surexpression de l'expression de la molécule CD1d induit cette même inhibition (Chun et al., 2003). En revanche, un traitement plus tardif (à 14 jours de la naissance) par l' α -GalCer n'induit aucun effet sur le développement de ces cellules (Pellicci et al., 2003). Ces expériences permettent de déduire que la sélection négative se fait de façon précoce. Cependant, l' α -GalCer n'est pas un ligand physiologique, il est donc difficile d'affirmer que ces études décrivent un mécanisme similaire à ceux induit par la reconnaissance de ligands endogènes naturels.

b) Maturation des cellules iNKT

Chez la souris, les cellules iNKT se développent principalement dans le thymus où elles se différencient et passent par quatre stades de développement (Figure 8). La population la plus précoce, appelée « **stade 0** » est caractérisée par les marqueurs CD24⁺ (HSA) CD44^{low} NK1.1^{low} (Benlagha et al., 2005). Ces cellules sont toutes CD4⁺ et la grande majorité est CD8⁻, même si de rares cellules CD4⁺/CD8⁺ ont été détectées à ce stade (Benlagha et al., 2005). Les cellules « stade 0 » sont très rares (moins de 0.001% des thymocytes totaux) et prolifèrent très peu. Puis, l'expression du CD24 diminue et les cellules entrent dans une phase de prolifération, dite « **stade 1** » au cours de laquelle elles sont caractérisées par le phénotype suivant CD24^{low} CD44^{low} NK1.1^{low}. Durant cette phase de prolifération, l'expression du CD44 augmente progressivement, et les cellules iNKT atteignent le « **stade 2** », caractérisé par le phénotype CD24^{low} CD44^{hi} NK1.1^{low}. L'étape de maturation qui suit est définie par l'augmentation de l'expression de récepteurs NK comme NK1.1 et les iNKT atteignent enfin de dernier stade de maturation, le « **stade 3** » caractérisé par le phénotype CD24^{low} CD44^{hi} NK1.1^{hi} et par une diminution de leur prolifération (Benlagha et al., 2002; Benlagha et al., 2005). Cette dernière étape peut avoir lieu dans le thymus ou en périphérie, une grande partie des cellules émigrants thymiques iNKT étant au stade 2 (Benlagha et al., 2002).

Si les marqueurs exprimés à la surface des cellules iNKT permettent de distinguer les différents stades de maturation, la production de cytokines permet également de les différencier. En effet, les cellules iNKT aux stades de maturation 1 et 2 sécrètent d'importantes quantités de cytokines telles que l'IL4 et l'IL10 et produisent peu d'IFN- γ , tandis que les cellules au stade 3 de maturation produisent un niveau élevé d'IFN- γ et peu

d'IL4 et d'IL10 (Benlagha et al., 2002; Pellicci et al., 2002). La transition vers le stade 3 de maturation dépend de l'expression de la molécule CD1d (McNab et al., 2005).

Chez l'homme, les cellules iNKT semblent suivre le même processus de maturation avec un **stade 3** de maturation qui se fait uniquement en périphérie, mais le stade précis au cours duquel les cellules iNKT DN apparaissent est encore inconnu. Néanmoins, toutes les cellules iNKT au stade 0 sont CD4⁺ CD44^{low} CD161^{low} (NK1.1 chez la souris), et les cellules iNKT DN sont détectées avec de très faibles fréquences au stade 1 de maturation et sont clairement représentées au stade 2. La majorité des cellules iNKT quittent le thymus au stade 2 (CD4⁺ CD161^{low}) et continuent leur maturation en périphérie (Baev et al., 2004) (Figure 8).

La population de précurseurs ayant conservé l'expression du facteur de transcription ROR-γt après la sélection positive perd l'expression des marqueurs CD4 et CD8 et deviendra CD44^{hi} CD161^{hi}. Cette population minoritaire est spécialisée dans la production de cytokines de type Th17 et plus spécifiquement d'IL17 (Doisne et al., 2011).

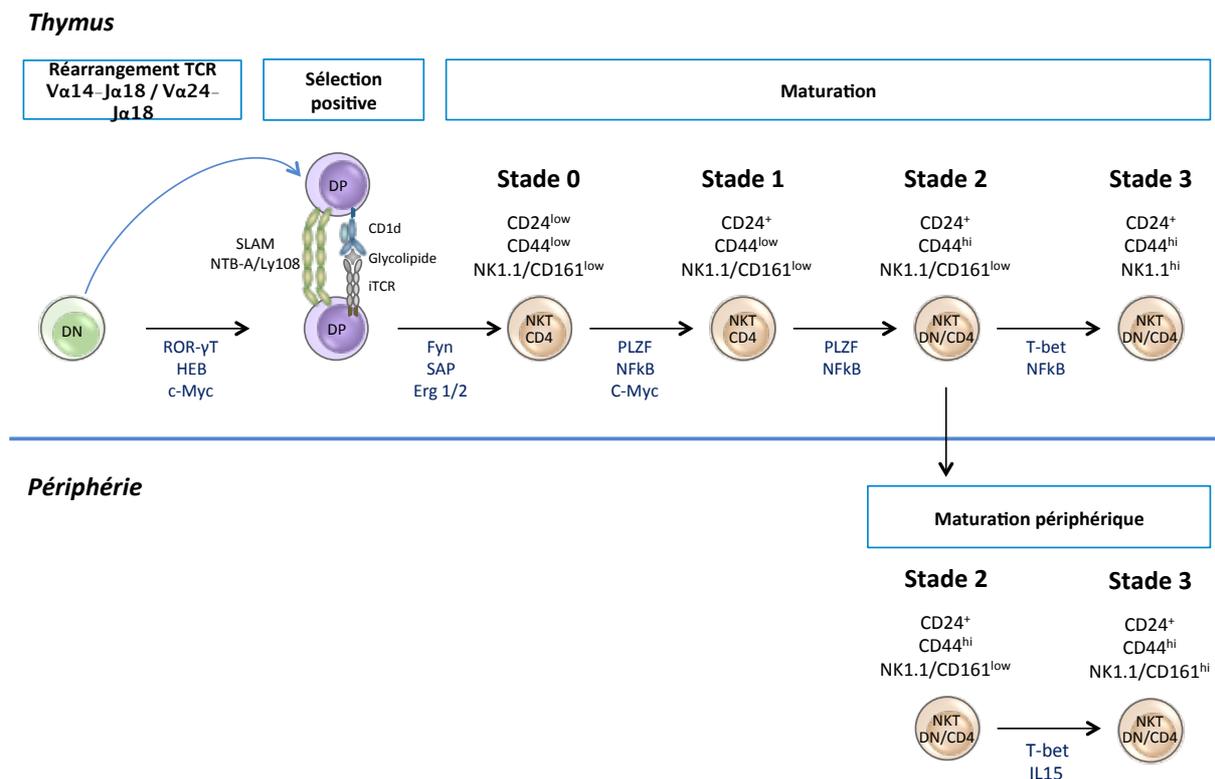


Figure 8 : Développement des cellules iNKT. Modèle linéaire de différenciation des cellules iNKT : le développement des cellules iNKT commence dans le thymus et peut se terminer en périphérie (chez l'Homme). On peut définir 4 stades de développement en se basant sur l'expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1 (CD161 chez l'Homme). Les facteurs importants intervenant dans le développement des cellules iNKT sont indiqués en bleu.

c) Facteurs importants pour le développement des cellules iNKT

Le développement et la maturation des cellules iNKT se fait par différents mécanismes régulés par de nombreux facteurs spécifiques : facteurs de transcription, cytokines et molécules exprimées à la surface cellulaire (Figure 8).

Au cours des **stades précoces** du développement, le facteur de transcription **ROR- γ t** est nécessaire pour le développement des cellules iNKT du fait de son rôle dans la survie des thymocytes DP. Son expression induit l'augmentation de celle des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xL ou Bcl-2 dans les thymocytes DP, ce qui permet la survie de ces cellules suffisamment longtemps pour que les réarrangements du TCR les plus distaux aient lieu (Guo et al., 2002). Les facteurs de transcriptions tels que **HEB** (E protein transcription factor) et **c-Myc** (myelocytomatoseis oncogene) sont également importants pour la survie des cellules DP. En effet, les thymocytes de souris déficientes pour HEB ou c-Myc sont bloqués au stade 0 de la différenciation (D'Cruz et al., 2010; Mycko et al., 2009).

Au cours de la **sélection positive**, l'interaction du complexe « lipide du soi-CD1d » avec le iTCR des cellules iNKT s'accompagne d'une l'augmentation de l'expression des facteurs de transcription **Egr1** et **Egr2** (Early Growth Factor 1/2). Cette augmentation est induite par l'augmentation du taux de calcium intracellulaire, lui-même provoqué par l'activation du TCR. Les souris déficientes pour Erg2 présentent une diminution importante du nombre de cellules iNKT après l'étape de sélection positive (Lazarevic et al., 2009). Erg1 et Erg2 induisent l'expression du facteur de transcription **PLZF**, qui joue un rôle essentiel dans la différenciation tardive des cellules iNKT (Seiler et al., 2012). La sélection positive des cellules iNKT s'accompagne également de signaux co-stimulateurs. En effet, les cellules iNKT dépendent fortement de la signalisation des récepteurs de la **famille SLAM : SLAM** (ou CD150) et **NTB-A** (ou Ly108 chez la souris) exprimés par les thymocytes DP (Griewank et al., 2007). Cette signalisation dépend de l'adaptateur **SAP** qui permet le recrutement de la kinase **Fyn**. Celle-ci constitue un important régulateur du développement des cellules iNKT aussi bien chez les souris que chez l'Homme. En effet, les souris déficientes en SAP et Fyn présentent un déficit profond en cellules iNKT (Eberl et al., 1999; Pasquier et al., 2005). De la même manière, les patients déficients en SAP présentent un déficit en cellules iNKT (Nichols et al., 2005).

Enfin, pour les stades plus tardifs, le facteur de transcription **NFκB** est essentiel. En effet, les souris déficientes pour ce facteur de transcription ont des cellules iNKT bloquées au stade 2 (Stanic et al., 2004).

Les interactions cellule-cellule ont également un rôle important dans la maturation des cellules iNKT. En effet, l'absence de molécules de co-stimulation **CD80** et **CD86** induit leur défaut de maturation thymique mais pas périphérique (Chung et al., 2008). Enfin, les cytokines telles que le **TGFβ** et l'**IL15** sont fortement impliquées dans la maturation des cellules iNKT (Doisne et al., 2009).

3. Distribution et localisation des cellules iNKT

Chez la souris adulte, la fréquence de cellules iNKT périphériques est élevée dans le foie (30 - 50%), dans la moelle osseuse (20 - 30%), dans le thymus (plus de 10%) et les dans les tissus adipeux (10%) (Lynch et al., 2015). Ces cellules sont beaucoup moins abondantes avec des fréquences très faible dans la rate (1-3%), les poumons (5-10%), ganglions lymphatiques (0.2%-1%), intestins (0.05-0.6%), et dans le sang (0.2%) (Bendelac et al., 2007; Brigl and Brenner, 2004; Salio et al., 2014).

Chez l'homme, la fréquence cellules iNKT dans le sang périphérique est également faible et cette proportion est très variable parmi les individus, allant cellules quasi indétectables à des fréquences de plus de 1% (Horst et al., 2012). Une étude chez des jumeaux montre que cette variabilité pourrait être génétiquement déterminée (Brodin et al., 2015). Une perte sélective des cellules iNKT est observée dans le sang périphérique des sujets âgés associée à un déséquilibre des sous populations (augmentation des cellules iNKT DN et CD4+) et une altération de leur fonction (Peralbo et al., 2007).

4. Caractéristiques fonctionnelles des cellules iNKT

Les cellules iNKT sont définies comme la population de NKT réactive au tétramère CD1d/α-GalCer et exprimant un TCR invariant pour une espèce donnée (chaîne α type Vα14-Jα18 chez la souris et Vα24-Jα18 chez l'homme ; chaînes β type Vβ 8.2, Vβ 7, Vβ 2 chez la souris et Vβ 11 chez l'homme). On distingue 5 sous-populations fonctionnelles parmi les cellules iNKT, chaque sous-population produit un ensemble de cytokines particulier. En plus de leur profil d'expression de cytokines qui leur est propre, chaque sous-population peut être identifiée par l'expression de facteurs de transcription qui généralement est en accord avec leurs profils de sécrétion de cytokines après leur activation.

Les cellules iNKT 1 expriment le facteur de transcription T-bet et secrètent principalement de l'IFN- γ ; **les cellules iNKT 2** expriment très fortement les facteurs de transcriptions GATA3 et PLZF et secrètent de l'IL4 et de l'IL13 (Lee et al., 2013) ; **les cellules iNKT 17** expriment un niveau intermédiaire le facteur de transcription PLZF, expriment ROR γ t et secrètent de l'IL17 ; **les cellules iNKT_{FH}** (follicular helper) expriment le facteur de transcription Bcl-6 et fournissent de l'aide aux lymphocytes B en secrétant de l'IL21 (Chang et al., 2011) ; **les cellules iNKT 10** représentent une sous-population unique de cellules iNKT qui n'expriment pas le facteur de transcription PLZF mais expriment Nfil3 (E4BP4) et secrètent de l'IL10 afin de créer un environnement immuno-régulateur (Lynch et al., 2015; Lynch et al., 2012).

Les cellules iNKT 1, iNKT 2 et iNKT 17 acquièrent leur capacité fonctionnelle dans le thymus pendant leur développement (Lee et al., 2013; Michel et al., 2008; Watarai et al., 2012), avant d'être distribuées dans les organes périphériques de manière tissu dépendante (Lee et al., 2015). À ce jour, les cellules iNKT_{FH} et iNKT 10 n'ont pas été décrites dans le thymus, leur origine et leur voie de développement restent encore à être déterminées. Il est possible soit que ces 2 sous-populations se développent dans le thymus avec des fréquences très faibles soit qu'elles se différencient après activation spécifique. En effet des cellules iNKT_{FH} sont induites dans la rate de souris après une injection d'antigènes lipidiques (Chang et al., 2011). De manière similaire, des cellules iNKT 10 peuvent être induites après stimulation antigénique (Lynch et al., 2015; Sag et al., 2014).

B. Maintenance et homéostasie périphérique des cellules iNKT

1. Homéostasie des cellules iNKT

Les données disponibles dans la littérature sur l'homéostasie périphérique concernent la population NKT dans son ensemble. Les cellules NKT requièrent de nombreux facteurs de croissances et signaux de survies pour leur maintenance en périphérie. Contrairement à la sélection thymique et la maturation qui requièrent une interaction constante avec la molécule CD1d, les cellules NKT matures ne semblent pas requérir chez la souris cette interaction en périphérie pour maintenir la prolifération homéostatique, la survie à long terme, leur distribution tissulaire (McNab et al., 2005).

Les cellules NKT répondent plutôt à des signaux générés par les **cytokines** telles que l'IL15 ou l'IL7 (McNab et al., 2005). Toutefois, le développement thymique et la prolifération homéostatique des cellules NKT sont altérés chez les souris déficientes en IL15, mais les

cellules iNKT ne sont pas complètement déplétées (Matsuda et al., 2002). Il est possible que cette observation soit due au fait que l'IL15 intervient de manière différente dans la différenciation des différentes sous-populations de cellules NKT. En effet, les cellules NKT de type I ou cellules iNKT, expriment la chaîne β du récepteur à IL2 / IL15 (CD122) et requièrent la présence d'IL15 pour leur développement et leur homéostasie, alors que les cellules NKT de type 2 et NKT 17 caractérisées par l'expression du récepteur à l'IL25 (IL17RB), se développent normalement en absence d'IL15 (Watarai et al., 2012). L'interaction **ICOS/ICOSL** est aussi requise à l'homéostasie et à la fonction des cellules NKT. En effet, la survie de cellules NKT transférées à des souris déficientes en ICOSL (ICOSL^{-/-}) est considérablement réduite et la capacité à produire des cytokines telles que l'IL4 et l'IL13 est altérée dans les cellules NKT ICOS^{-/-} (Akbari et al., 2008). Plusieurs études soulignent le rôle de plusieurs **molécules de signalisation et de facteurs de transcription** dans le développement et l'homéostasie des cellules NKT en plus de l'expression de l'IL2R- β , IL7R- α , IL15R- α et la chaîne commune γ (Godfrey et al., 2010). En plus de ces facteurs, la signalisation via les récepteurs aux chémokines est aussi impliquée dans la régulation de l'homéostasie des cellules NKT en périphérie (Godfrey et al., 2010). Enfin, des mutations du gène XIAP, (X-linked Inhibitor of Apoptosis) est un inhibiteur physiologique des caspases 3, 7 et 9, sont à l'origine du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X de type 2 (X-linked lymphoproliferative syndrome, XLP), un déficit immunitaire primitif caractérisé par une susceptibilité accrue à l'infection par l'EBV. Les patients souffrants du XLP-2 présentent un défaut en cellules iNKT dans le sang. Gérart et al. montrent que ces cellules présentent un phénotype pro-apoptotique régulé par l'expression de la molécule **XIAP** (Gerart et al., 2013). En effet, lors de l'infection par l'EBV, les cellules iNKT des patients XLP-2 vont être activées et répondre à l'infection comme chez des donneurs sains. Cependant, cette activation va induire l'apoptose de ces cellules, en absence de XIAP cette phase d'apoptose est plus importante conduisant ainsi à une forte diminution des cellules iNKT secondairement à l'infection par l'EBV. Au total, cette étude démontre que l'homéostasie périphérique des cellules iNKT dépend de l'expression de XIAP.

2. Coopération cellules iNKT et lymphocytes B

Les lymphocytes B sont également essentiels à l'expansion et l'activation des cellules iNKT et la présentation d'antigènes lipidiques par la molécule CD1d exprimée sur ces cellules est un élément indispensable dans cette interaction.

Une étude propose que les lymphocytes B de la zone marginale jouent un rôle important dans l'activation des cellules iNKT en coopération avec les cellules dendritiques (Bialecki et al., 2009). En effet, les lymphocytes B de la zone marginale sont les cellules qui expriment le plus fortement la molécule CD1d par rapport à toutes les autres cellules présentatrices (Roark et al., 1998). Ces cellules sont très exposées aux antigènes et participent à l'induction d'une réponse anticorps de type inné. Les auteurs confirment dans leur étude que les lymphocytes B de la zone marginale chargés avec de l' α -GalCer sont capables d'activer efficacement les cellules iNKT (Bialecki et al., 2009).

Par ailleurs, chez l'homme, des maladies auto-immunes (lupus, syndrome de gougrot sjogren) sont associées à un nombre diminué de cellules iNKT et cette diminution est corrélée avec une altération de l'expression de CD1d à la surface des lymphocytes B. De plus, la prolifération *in vitro* des cellules iNKT de patients lupiques peut être bloquée par l'adjonction en culture d'un anticorps bloquant CD1d (Bosma et al., 2012). Enfin, une étude récente rapporte une diminution significative des cellules iNKT chez les patients atteints de DICV. Ce défaut en cellules iNKT pouvait être corrélé au défaut constitutif de génération de lymphocytes B mémoires (Fulcher et al., 2009).

C. Activation des cellules iNKT

Les cellules iNKT reconnaissent des antigènes lipidiques, dans la majorité des cas des glycolipides présentés par la molécule CD1d. Aujourd'hui, dans la plupart des études l' α -GalCer synthétique, qui est un fort stimulateur des cellules iNKT, est utilisé pour étudier les réponses de ces cellules *in vitro* mais également *in vivo* (Kawano et al., 1998). Plusieurs autres antigènes lipidiques endogènes ou exogènes qui stimulent les réponses iNKT ont été identifiés. En effet, les cellules iNKT peuvent être activées de façon directe par des antigènes lipidiques exogènes (Figure 9A) ou, en l'absence d'antigènes lipidiques exogènes, de façon indirecte par la reconnaissance par leur iTCR de la molécule CD1d présentant des antigènes lipidiques du soi (Figure 9B) et/ou par les cytokines produites par les CPA (Figure 9C) (Mattner et al., 2005).

1. Reconnaissance directe des lipides dérivés de pathogènes

La voie directe implique la reconnaissance par le iTCR des cellules iNKT de glycolipides microbiens issus de la dégradation lysosomale des membranes de pathogènes présentés par la molécule CD1d. Ces antigènes lipidiques ont été identifiés chez différents microorganismes,

principalement des bactéries avec pour exemple l' α -glucuronosylceramide et l' α -galacturonosylceramide identifiés chez *Sphingomonas* (Mattner et al., 2005), des parasites et des champignons. Après reconnaissance du complexe CD1d-lipide par le iTCR, la cellule iNKT reçoit un signal fort d'activation par son iTCR (Brennan et al., 2013) responsable d'une forte stimulation des cellules iNKT et de leur production d'INF- γ (Figure 9A). Cette voie constitue le mode d'activation principal des cellules iNKT (Brennan et al., 2013).

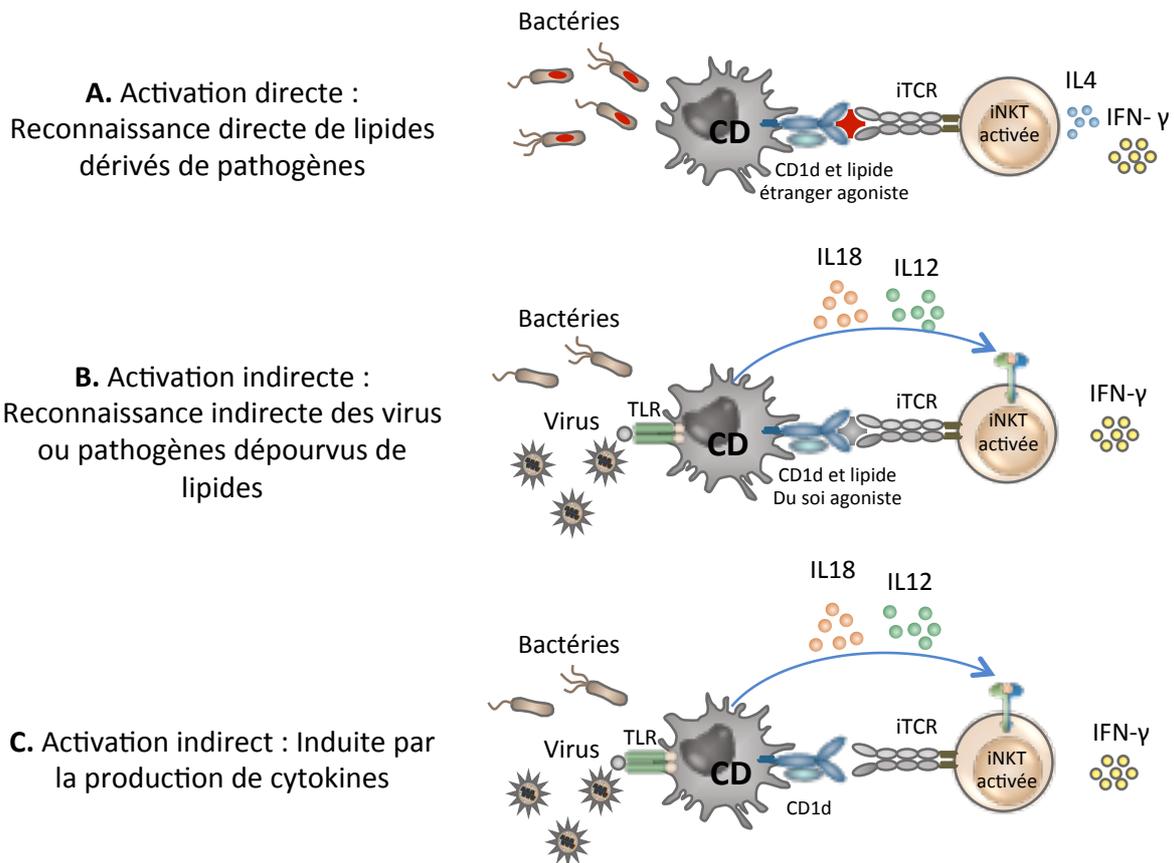


Figure 9 : Modes d'activation des cellules iNKT. **A.** Les CPA présentent les lipides étrangers des bactéries par la molécule CD1d. La reconnaissance directe des lipides dérivés des pathogènes permet l'activation des cellules iNKT. **B.** Activation des cellules iNKT par des cytokines comme l'IL12 par les CPA après stimulation de leur TLR et par la présentation par CD1d de lipides du soi. **C.** Activation des cellules iNKT par des cytokines comme l'IL12 par les CPA après stimulation de leur TLR (Rossjohn et al., 2012).

2. Reconnaissance indirecte des pathogènes dépourvus de lipides

Les virus ne possédant pas la machinerie enzymatique adaptée pour la synthèse des lipides, les lipides spécifiques de virus n'existent donc pas. Une stratégie alternative de stimulation des cellules iNKT repose donc sur leur activation par des cytokines telles que l'IL12 et l'IL18 produites par les cellules présentatrices d'antigènes et leur stimulation conjointe secondaire à la reconnaissance par leur iTCR de lipides du soi dont le profil a été modifié par l'infection

virale (Figure 9B) (Tupin et al., 2007). En effet, l'infection de la cellule cible a pour conséquence, secondairement à l'activation des TLR intracellulaires tels que les TLR3, 7 et 9, d'augmenter et de modifier la composition des lipides du soi présentés, de diminuer leur dégradation et d'augmenter l'expression de CD1d.

Chez l'Homme, dans un contexte d'infection par la bactérie *Salmonella typhimurium* dépourvue d'antigènes lipidiques, la réponse des cellules iNKT est activée. Toutefois l'engagement de leur TCR n'est pas suffisant pour une activation optimale des iNKT puisque leur activation est renforcée par la production d'IL12 par les cellules dendritiques activées par la voie des TLR (Brigl et al., 2003; Mattner et al., 2005).

Enfin, une autre étude rapporte que les cellules iNKT peuvent être activées uniquement par un signal cytokinique fort (IL18 et IL12) en l'absence d'engagement du TCR (Figure 8C) (Leite-De-Moraes et al., 1999).

D. Rôle des cellules iNKT dans les pathologies

Le rôle régulateur des cellules iNKT a été mis en évidence dans des infections microbiennes, dans des maladies auto-immunes, dans les allergies (Goubier et al., 2013) et les cancers (Taniguchi et al., 2010). De fait, des variations du taux de ces cellules sont décrites dans ces différentes pathologies. Seuls seront traités ici le rôle de ces cellules dans les infections virales et les cancers.

1. Rôle antiviral des cellules iNKT

Bien que les virus n'expriment pas d'antigènes lipidiques, les cellules iNKT sont néanmoins impliquées dans la réponse antivirale. Dans des modèles murins, de nombreuses études montrent le rôle de ces cellules dans la réponse antivirale en contribuant à la réponse innée, en aidant à contrôler la charge virale et en participant à la régulation de la réponse adaptative (Diana and Lehuen, 2009). Moins de données sont disponibles chez l'homme mais le rôle de ces cellules émerge progressivement, principalement dans les contextes d'infections virales à Herpès virus et d'infection VIH.

a) Infections à Herpèsvirus

Chez l'homme, plusieurs arguments soutiennent le rôle des iNKT dans le contrôle des infections à Herpèsvirus. Les patients avec un déficit en cellules iNKT sont particulièrement

vulnérables aux infections par les virus de ce groupe. Ainsi, 2 enfants de 6 et 11 ans qui ont développé après vaccination une infection sévère par le **VZV** présentaient comme seul défaut immunologique identifié une diminution profonde des cellules iNKT. Cette diminution était associée à une diminution de l'expression de CD1d sur les cellules CPA dans le sang périphérique (Banovic et al., 2011; Levy et al., 2003).

Par ailleurs, les patients présentant XLP ont des mutations germinatives du gène **SH2D1A** codant pour la protéine **adaptatrice SAP** (mutation responsable de **l'XLP de type 1**) ou du gène **BIRC4** qui code pour la protéine XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein, mutation responsable de **l'XLP de type 2**), les patients XLP-1 présentent un défaut de développement des cellules iNKT alors que les patients XLP-2 présentent un défaut d'homéostasie périphérique de ces cellules (Nichols et al., 2005; Rigaud et al., 2006). En effet, le développement de ces cellules est dépendant de l'expression de la molécule adaptatrice SAP. Le défaut d'expression de SAP n'a pas d'effet sur le nombre des cellules NK et des lymphocytes T CD8 (Pasquier et al., 2005). Cependant, la cytotoxicité de ces cellules est profondément altérée vis-à-vis de lymphocytes B infectés par l'EBV (Dupre et al., 2005; Sharifi et al., 2004). Toutefois, le défaut en XIAP n'intervient pas dans le développement des cellules iNKT, mais confère à ces cellules une sensibilité plus importante à l'apoptose en périphérie (Gerart et al., 2013). A noter que chez les patients déficients en XIAP aucun défaut de cytotoxicité n'a été rapporté. Au total, l'absence de l'expression de SAP ou de XIAP conduit à des défauts fonctionnels et cellulaires bien distincts, à l'exception du déficit en cellules iNKT qui représente le seul défaut commun aux patients déficients pour SAP et pour XIAP. Ces patients sont incapables de contrôler les lymphocytes B infectés par l'EBV et développent des lymphoproliférations B sévères (Nichols et al., 2005; Rigaud et al., 2006).

De plus, une étude *in vitro* montre que des lymphocytes B infectés par EBV induisent directement la production d'IFN- γ et l'activité cytotoxique de cellules iNKT, alors que la déplétion de ces cellules conduit à une augmentation de la charge virale d'EBV et du pourcentage de lymphocytes B infectés (Chung et al., 2013). Cette dernière étude confirme le rôle des cellules iNKT dans le contrôle de l'infection des lymphocytes B par EBV. Dans les modèles murins, les souris déficientes pour la molécule CD1d (CD1d^{-/-}) ou dépourvues en cellules iNKT (Ja18^{-/-}) sont également plus susceptibles à l'infection par le virus **HSV-1** (Grubor-Bauk et al., 2008; Grubor-Bauk et al., 2003). Une autre étude montre que les réponses humorales spécifiques d'HSV-1 et la production d'IFN- γ sont significativement diminuées chez les souris Ja18^{-/-} (Raftery et al., 2014). Enfin, dans un contexte d'infection vaginale par **HSV-2** les souris CD1d^{-/-} et Ja18^{-/-} sont 10 fois plus susceptibles au virus.

b) Virus de l'immunodéficience Humaine

Les patients infectés par le VIH présentent une réduction significative de la fréquence des cellules iNKT et ce déficit persiste plus d'un an après contrôle de l'infection par des antirétroviraux (Motsinger et al., 2002; van der Vliet et al., 2006; van der Vliet et al., 2002). Une déplétion spécifique des cellules iNKT CD4⁺ est observée chez ces patients comparativement aux cellules iNKT CD4⁻. Ce qui correspond au tropisme de ce virus pour les cibles cellulaires exprimant la molécule CD4. L'observation d'une diminution de ces cellules dans cette infection est donc la conséquence de leur destruction par la réplication virale. Ces cellules présentent un phénotype d'exhaustion avec : une capacité de prolifération et de production de cytokines telles que l'IFN- γ , TNF et l'IL4 très réduite en réponse à la stimulation par l' α -GalCer et l'IL2 *in vitro* et une forte expression des marqueurs d'exhaustion tel que PD-1 (Vasan et al., 2007). De plus, il est rapporté des modifications de la répartition des sous-populations CD4⁺/CD8⁺/DN associées à la diminution des capacités fonctionnelles de ces cellules. Il est intéressant de noter que chez les patients infectés par le VIH ces anomalies ne sont pas réversibles après deux ans de traitements antirétroviraux (Moll et al., 2010) sauf si celui-ci est introduit très précocement en primo-infection (Vasan and Tsuji, 2010). Toutefois, les conséquences précises du déficit des cellules iNKT dans l'infection par le VIH sont encore à déterminer.

c) Modulation par les virus de la présentation par CD1d

Les virus sont connus pour échapper à leur reconnaissance par les CTL en régulant négativement l'expression en surface des molécules du CMH de classe I. Un argument indirect témoignant de l'importance des cellules iNKT dans la défense anti-virale est l'importance des stratégies d'échappement immunitaire mises en place par les virus qui consistent à altérer la présentation des antigènes par la molécule CD1d.

En particulier, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) échappe à la reconnaissance par les cellules iNKT en régulant négativement l'expression en surface de la molécule CD1d par le biais de trois protéines virales. L'incubation de cellules avec la protéine recombinante gp120 a pour conséquence une diminution de l'expression membranaire de la molécule CD1d (Hage et al., 2005). La protéine Nef accélère l'internalisation de la molécule CD1d de la membrane et la redirige vers le réseau trans-golgien. Enfin, la protéine virale Vpu inhibe le recyclage de CD1d du compartiment endosomal vers la surface de la cellule (Moll et al., 2010). Le Papillomavirus humain (HPV) interfère aussi avec la présentation des lipides par

la molécule CD1d. La protéine E5 interagit avec la calnexine et bloque la sortie des molécules CD1d du reticulum endoplasmique puis favorise sa dégradation par le protéasome (Miura et al., 2010). Dans l'infection liée au **HHV-8**, la molécule CD1d est également la cible d'une régulation négative par les protéines virales modulatrices K3 et K5 (ou respectivement MIR 1 et MIR 2) pendant la phase lytique de l'infection virale. Ces protéines virales augmentent l'endocytose du CD1d membranaire sans en augmenter la dégradation lysosomale. De plus, dans un modèle *in vitro*, l'expression de K5 dans la lignée cellulaire BJAB inhibe l'activation des cellules iNKT (Sanchez et al., 2005). Enfin, l'infection par **HSV** est associée à un recyclage défectif de la molécule CD1d qui reste piégée dans l'endosome tardif ce qui a pour résultat une diminution de son expression à la surface de la cellule (Yuan et al., 2006).

De façon un peu différente, l'infection par le virus de la vaccine (VV) ou le virus de la Stomatite vésiculaire (VSV) a pour conséquence une diminution de l'activation des cellules iNKT alors que l'expression de la molécule CD1d reste inchangée. Ces 2 virus agissent en modulant le trafic intracellulaire de CD1d dépendant des MAP-kinase et altèrent ainsi le répertoire des lipidiques présentés par CD1d (Renukaradhya et al., 2005).

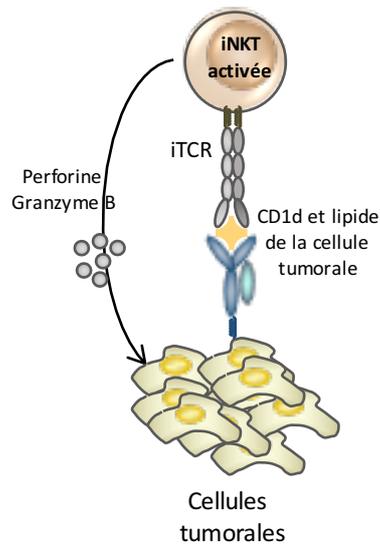
2. Rôle antitumoral des cellules iNKT

L'observation initiale que l'injection de l' α -GalCer chez des souris pouvait diminuer développement de tumeurs, a permis de démontrer que cet effet était dû à une activation spécifique des cellules iNKT (Kawano et al., 1997). En plus d'exercer un rôle protecteur dans différents modèles de tumeurs chez la souris, les cellules iNKT activées *in vivo* par l' α -GalCer (Smyth et al., 2000) ou l'adjonction d'IL12 (Cui et al., 1997), jouent également un rôle important au cours de l'immunosurveillance antitumorale. En effet, suite au transfert adoptif de cellules iNKT à des souris $J\alpha 18^{-/-}$, Crowe et al. démontrent la capacité des iNKT à protéger les souris $J\alpha 18^{-/-}$ du développement de sarcome ; Ils montrent que cette action passe bien par une interaction directe iTCR /CD1d confirmant ainsi les premières observations (Crowe et al., 2002).

L'activation des cellules iNKT au cours de l'immunosurveillance peut avoir lieu de manière directe, par la reconnaissance de lipides du soi présentés par la molécule CD1d (Figure 10A). En effet, les cellules du lymphome B NS0 qui expriment très fortement la molécule CD1d induisent la production de cytokines par les cellules iNKT et la fonction cytotoxique de ces cellules (Renukaradhya et al., 2008). Dans un modèle souris de cancer du sein, la régulation négative de l'expression de la molécule CD1d à la surface des cellules tumorale inhibe la

fonction anti-tumorale des cellules iNKT et induit une progression du cancer (Hix et al., 2011).

A. Fonction anti-tumorale directe



B. Fonction anti-tumorale indirecte

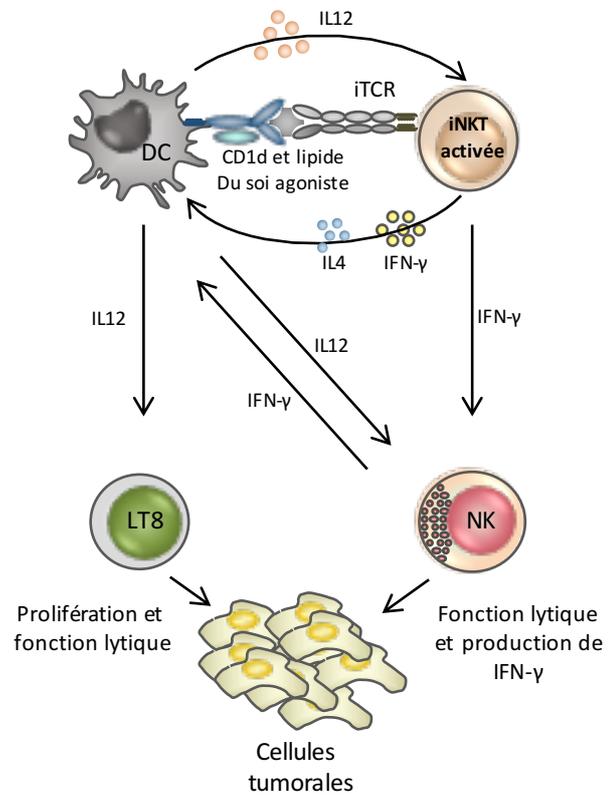


Figure 10. Fonction anti-tumorale des cellules iNKT. **A.** les cellules iNKT peuvent reconnaître les lipides de la cellule tumorale présentés par la molécule CD1d exprimée par les cellules tumorales qu'elles éliminent par cytotoxicité directe. **B.** Lorsque les cellules tumorales n'expriment pas la molécule CD1d, les cellules iNKT peuvent être activées indirectement par les cellules présentatrices d'antigènes exprimant CD1d après activation par leur TLR. L'activation bidirectionnelle des cellules iNKT et des cellules dendritiques permet l'activation des cellules NK et des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux, induisant ainsi une réponse anti-tumorale indirecte.

L'autre mode d'activation indirect, a également été décrit avec la présentation d'antigènes lipidiques issus de cellules tumorales par les cellules présentatrices d'antigènes qui expriment la molécule CD1d (Figure 10B) (Wu et al., 2003). Les cellules iNKT activées par l' α -GalCer, produisent de l'IFN- γ , qui va activer les cellules NK, augmenter leur cytotoxicité et d'induire la maturation des cellules dendritiques (Swann et al. 2004). Si chez la souris l' α -GalCer a fait ses preuves comme agent anti-tumoral, les études chez l'Homme sont moins convaincantes. En effet, les premiers essais cliniques ne sont pas encourageants puisqu'aucune réponse anti-tumorale n'est observée chez des patients présentant un cancer du poumon à des stades

avancés traités quotidiennement avec le KRN7000 (Motahashi et al. 2008). Des études plus récentes utilisant des APC chargées avec de l' α -GalCer dans des situations de cancer de la peau et ou ORL ont donné de meilleurs résultats, même si ceux-ci restent très hétérogènes (Motahashi et al. 2011).

Objectifs de la thèse

La Maladie de Castleman Multicentrique peut être considérée comme le résultat d'une perte de contrôle immunitaire des cellules B infectées par HHV-8 qui prolifèrent. Des travaux de l'équipe rapportent la présence de réponses T anti-HHV-8 polyfonctionnelles mais qui restent en fréquence très faibles. Ceci suggère la présence de dérégulations plus fines des réponses immunes. De par l'importance des cellules iNKT dans le contrôle des virus Herpès et du fait d'une absence de cellules iNKT chez les patients ayant un déficit génétique lié à l'X associé à des lymphoproliférations associées à l'infection par EBV sévères nous avons émis l'hypothèse d'un déficit de ces cellules immuno-régulatrices chez les patients MCM HHV-8+. Pour analyser cette hypothèse nous avons décidé de comparer la fréquence et la fonction des cellules iNKT chez des patients MCM HHV-8+ et des contrôles, sains ou et infectés par HHV-8 porteurs d'un Sarcome de Kaposi. Enfin, devant d'éventuels défauts de ces cellules les causes seront recherchées.

Peu de données et qui restent limitées à un très faible nombre de patients, sont disponibles sur les cellules B infectées par HHV-8 qui prolifèrent au cours de la MCM en dehors de leur caractérisation phénotypique dans les tissus lymphoïdes. Le deuxième axe du projet s'attachera à caractériser (caractérisation en cytométrie paramétrique et une analyse transcriptomique) les lymphocytes B infectés par HHV-8 qui prolifèrent lors de la MCM afin de définir précisément leur stade de différenciation et de mettre en évidence des modulations phénotypiques et moléculaires qui conduisent ces cellules à proliférer et à d'échapper aux réponses immunes.

Résultats

I. Altérations des cellules iNKT et des lymphocytes B mémoires dans la Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8

Zineb Sbihi,^{1,*} Antoine Dossier,^{1,2,*} David Boutboul,³ Lionel Galicier,³ Christophe Parizot,^{1,4} Amandine Emarre,¹ Bénédicte Hoareau,⁵ Nicolas Dupin,⁶ Anne-Geneviève Marcelin,^{7,8} Anne Oudin,¹ Claire Fieschi,³ Félix Agbalika,⁹ Brigitte Autran,^{1,4} Eric Oksenhendler,³ and Guislaine Carcelain^{1,4}

Sbihi, Z *et al.* (2017). “iNKT and memory B-cell alterations in HHV-8 multicentric Castleman disease”. *Blood* 129, 855-865.

Uldrick, TS (2017), Editorial. : “iNKT cell defects in HHV-8-associated MCD”. *Blood* 129, 806-807.

Les cellules invariantes natural killer T (iNKT) représentent une sous-population particulière des cellules T, à l'interface entre l'immunité innée et adaptative. Elles utilisent leur TCR invariant pour reconnaître les antigènes lipidiques présentés par la molécule CD1d à la surface des lymphocytes B. S'il est prouvé que le défaut quantitatif ou qualitatif des cellules iNKT peut être impliqué dans la susceptibilité à des infections virales, le rôle des cellules iNKT dans le développement de MCM, lymphoprolifération B liée au virus HHV-8, n'est à ce jour pas connu. Nous avons donc analysé dans un premier temps la fréquence et la fonction des cellules iNKT chez des patients MCM HHV-8+ comparativement à des témoins.

Nos travaux rapportent un déficit quantitatif et de prolifération des cellules iNKT chez les patients porteurs d'une Maladie de Castleman Multicentrique. Plusieurs hypothèses ont été testées quant à la cause de ce déficit cellulaire. La première hypothèse que nous avons éliminée est celle d'une absence chez ces patients de la cytokine nécessaire à leur homéostasie périphérique qu'est l'IL-15 puisque son adjonction *in vitro* ne restaure pas la capacité proliférative des cellules iNKT des patients MCM. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la présentation des antigènes lipidiques par la molécule CD1d, qui est exprimée à la surface des CPA, participe au maintien, à l'activation et la prolifération des cellules iNKT. De plus, les protéines virales qui s'expriment lors du cycle de réplication lytique de HHV-8 induisent une régulation négative de l'expression de surface de CD1d. Nous avons donc dans

un second temps postulé que l'absence de prolifération des cellules iNKT pouvait être liée à une anomalie de l'expression de la molécule CD1d sur les différentes CPA. Nous avons analysé en CMF l'expression de cette molécule sur les différentes sous populations de lymphocytes B (naïfs, B de la zone marginale, B mémoires switchés, IgM only), les monocytes et les cellules dendritiques dans les différents groupes de patients MCM et contrôles. Nous n'observons aucune différence d'expression de la molécule CD1d. Par contre cette analyse nous a permis de mettre en évidence un déficit en cellules B de la zone marginale (en périphérie et dans la rate des patients). Afin de nous assurer que ce déficit n'était pas en cause dans le déficit de prolifération des cellules iNKT, nous avons vérifié chez des donneurs sains que la déplétion en lymphocytes B n'induisait pas une absence de prolifération des iNKT en culture *in vitro*.

Du fait de la coopération connue entre les cellules iNKT et les lymphocytes B pour leur homéostasie réciproque, l'étude a ensuite porté sur l'analyse d'éventuels défauts de coopération pour leur homéostasie entre ces deux types cellulaires chez les patients atteints d'une MCM. Dans la seconde partie de l'étude, nous avons donc analysé l'éventuelle participation des lymphocytes B dans le déficit des cellules iNKT et inversement. Pour cela, un protocole de permettant de maintenir en culture les lymphocytes B a été mis au point puis des expériences de déplétion / adjonction des différents partenaires cellulaires sains / malades (MCM) ont été réalisés. Nos résultats montrent que les lymphocytes B de patients MCM HHV-8+ ne sont probablement pas responsables des défauts quantitatifs et qualitatifs des cellules iNKT observé chez nos patients, mais suggère au contraire que les cellules iNKT sont probablement responsables des défauts quantitatifs des lymphocytes B mémoires CD27⁺ IgD⁺ observés chez les patients MCM HHV-8+.

L'ensemble de nos résultats rapporte un déficit qualitatif et fonctionnel des cellules iNKT associé à la MCM et montre que ce déficit induit un déséquilibre des sous-populations lymphocytaires B. Ces résultats pourraient également suggérer un rôle de ces deux populations cellulaires dans la physiopathologie de la MCM.

IMMUNOBIOLOGY

iNKT and memory B-cell alterations in HHV-8 multicentric Castleman disease

Zineb Sbihi,^{1,*} Antoine Dossier,^{1,2,*} David Boutboul,³ Lionel Galicier,³ Christophe Parizot,^{1,4} Amandine Emarre,¹ Bénédicte Hoareau,⁵ Nicolas Dupin,⁶ Anne-Geneviève Marcelin,^{7,8} Anne Oudin,¹ Claire Fieschi,³ Félix Agbalika,⁹ Brigitte Autran,^{1,4} Eric Oksenhendler,³ and Guislaine Carcelain^{1,4}

¹Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Université Paris 06, INSERM, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Unité Mixte de Recherche (UMR) 1135, Équipes de Recherche Labellisées Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) 8255, Paris, France; ²Hôpital Bichat, Médecine Interne, Paris, France; ³Hôpital Saint-Louis, Immunologie Clinique, Equipe d'Accueil 3518, Université Paris Diderot Paris 7, Paris, France; ⁴Département d'Immunologie, CHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (APHP), Paris, France; ⁵Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, Unité Mixte de Service 30, l'Unité Mixte Imagerie et Cytométrie, Plateforme Cytométrie Pitié-Salpêtrière, Paris, France; ⁶Service de Dermatologie, Hôpital Cochin, APHP et Institut Cochin U1016 INSERM, Université Paris Descartes, Paris, France; ⁷Sorbonne Universités, UPMC Université Paris 06, INSERM, UMR 1136, Paris, France; ⁸Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, Service de Virologie, CHU Pitié-Salpêtrière, APHP, Paris, France; and ⁹Hôpital Saint-Louis, Virologie, Paris, France

Key Points

- HHV-8 MCD is associated with a decrease of iNKT and memory B cells.
- iNKT decrease contributes to B-cell abnormalities in coculture experiments.

Human herpesvirus 8 (HHV-8) is the causative agent of Kaposi sarcoma (KS) and multicentric Castleman disease (MCD), a life-threatening, virally induced B-cell lymphoproliferative disorder. HHV-8 is a B-lymphotropic γ -herpesvirus closely related to the Epstein-Barr virus (EBV). Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate-like T cells that play a role in antiviral immunity, specifically in controlling viral replication in EBV-infected B cells. Decline of iNKT cells is associated with age or HIV infection, both situations associated with HHV-8-related diseases. We analyzed iNKT cells in both blood ($n = 26$) and spleen ($n = 9$) samples from 32 patients with HHV-8 MCD and compared them with patients with KS ($n = 24$) and healthy donors ($n = 29$). We determined that both circulating

and splenic iNKT cell frequencies were markedly decreased in patients with HHV-8 MCD and were undetectable in 6 of them. Moreover, iNKT cells from patients with HHV-8 MCD displayed a proliferative defect after stimulation with α -galactosylceramide. These iNKT cell alterations were associated with an imbalance in B-cell subsets, including a significant decrease in memory B cells, particularly of marginal zone (MZ) B cells. Coculture experiments revealed that the decrease in iNKT cells contributed to the alterations in the B-cell subset distribution. These observations contribute to a better understanding of the complex interactions between HHV-8 and immune cells that cause HHV-8-related MCD. (*Blood*. 2017;129(7):855-865)

Introduction

The B-lymphotropic γ -herpesvirus human herpes virus-8 (HHV-8), closely related to Epstein-Barr virus (EBV), establishes lifelong latency in B cells.¹ Besides causing Kaposi sarcoma (KS), several lymphoproliferative disorders are associated with HHV-8 infection, such as HHV-8-related multicentric Castleman disease (HHV-8 MCD).^{2,3} HHV-8 MCD is a systemic lymphoproliferative disorder that occurs at higher rates in patients infected with HIV as well as in elderly patients who are not otherwise immunocompromised.^{2,3} It is characterized by recurrent flares of severe inflammatory symptoms that include fever, diffuse lymph nodes, and spleen enlargement.⁴ Clinical exacerbations of HHV-8 MCD are associated with a rapid expansion of HHV-8-infected plasmablasts as well as very high HHV-8 loads, suggesting an association of flares with uncontrolled virus replication.⁵

T-cell responses, particularly those of CD8⁺ T cells, play key roles in the control of chronic viral infections; however, the magnitude and functional profile of HHV-8-CD8⁺ T-cell responses are similar between asymptomatic HHV-8 carriers and patients with HHV-8 MCD.⁶ Further, HHV-8 MCD that generally occurs in patients with low CD4⁺ T-cell counts may occur despite CD4⁺ T-cell counts in normal ranges.^{3,7} Thus, HHV-8 MCD may not arise from a CD8⁺ T-cell qualitative defect or from a CD4⁺ T-cell quantitative defect.

The results accumulated over the past decade illuminate the critical role of innate immune responses that control herpesviruses, particularly those mediated by invariant natural killer T (iNKT) cells.⁸⁻¹² iNKT cells represent a unique subpopulation of T cells with a highly restricted T-cell receptor (TCR) repertoire, which

Submitted 3 June 2016; accepted 2 November 2016. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, 9 November 2016; DOI 10.1182/blood-2016-06-719716.

*Z.S. and A.D. contributed equally to this work.

Presented in abstract form at the 49th annual meeting of the French Society of Immunology, Lille, France, 4 November 2014.

The online version of the article contains a data supplement.

There is an Inside *Blood* Commentary on this article in this issue.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2017 by The American Society of Hematology

express rearranged genes encoding V α 24-J α 18 in humans, coupled with a restricted repertoire of TCR- β chains.^{13,14} After activation by glycolipid antigens presented by the major histocompatibility complex class 1–related molecule CD1d, iNKT cells acquire cytotoxic activity and rapidly secrete large quantities of T helper 1 and T helper 2 cytokines that stimulate the expansion and maturation of dendritic cells (DCs), natural killer (NK) cells, B cells, and conventional T cells.^{15,16}

Accumulating evidence supports a role for iNKT cells in controlling herpesvirus infections. The absence of iNKT cells is a key immunological abnormality of X-linked lymphoproliferative (XLP-1) syndrome, characterized by fulminant infectious mononucleosis subsequent to primary EBV infection, dysgammaglobulinemia, and the presence of a high frequency of EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders.¹⁷ Defects in iNKT cells also occur in primary immunodeficiencies characterized by a high susceptibility to EBV, leading to EBV-associated pathologies.^{12,18} Further, *in vitro* studies reveal that EBV-infected B cells directly induce the production of interferon- γ (IFN- γ) and the cytotoxic activity of iNKT cells, whereas the depletion of iNKT cells increases viral titers and the number of EBV-infected B cells.¹⁹ Decline of iNKT cells is associated with age²⁰ or HIV infection,²¹ which are both situations associated to HHV-8–related diseases.^{3,22}

HHV-8 MCD resembles many aspects of EBV-induced B-cell polyclonal lymphoproliferative disorders such as XLP, and iNKT cells are essential for the immune control of EBV-infected B cells. Therefore, we postulated that iNKT cell responses are altered during HHV-8 MCD.

Patients, materials, and methods

Patients and controls

This study included 3 groups of subjects (Table 1). The first group comprised patients with HHV-8 MCD. Samples of their blood, spleen, or both were collected at Saint-Louis Hospital (E.O.) from 32 patients (24 HIV⁺ and 8 HIV⁻). Splenectomy was performed during active MCD; the recorded reasons were symptomatic splenomegaly, suspicion of lymphoma, or both. Blood samples were collected from 26 patients (18 HIV⁺ and 8 HIV⁻), spleen samples from 9 patients (8 HIV⁺ and 1 HIV⁻), and samples from both sources were available for 3 patients. The second group comprised 24 patients with KS from Saint-Louis (E.O.) and Cochin (N.D.) hospitals. The third group comprised 29 healthy donors (HDs) from the Etablissement Français du sang. Table 1 summarizes patients' clinical and laboratory characteristics; supplemental Tables 1 and 2 (available on the *Blood* Web site) provide additional clinical details. Flare was defined as the presence of constitutional symptoms, progressive lymph node or spleen enlargement, and elevated levels of serum markers of inflammation. Remission was defined as the absence of these findings.

Cell isolation

Blocks of spleen were mechanically dissociated and digested using type VII collagenase and DNase (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 supplemented with 2% fetal calf serum (Biowest). Cell aggregates were further dissociated using 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich) with agitation. Spleen mononuclear cells (SMCs) were isolated from splenocyte suspensions, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood through Ficoll-Hypaque (Eurobio).

B cells were negatively isolated or depleted from PBMCs using magnetic beads; iNKT cells were depleted with anti-invariant chain V α 24-J α 18 of the TCR (iTCR)-coated magnetic beads (Miltenyi Biotec) (supplemental Figure 1).

Cell culture

To expand iNKT cells, PBMCs were cultured in RPMI 1640 (Eurobio), 2 mM L-glutamine, 1% pyruvate, 1% nonessential amino acids, 1% antibiotic (Life Technologies), 10% fetal calf serum, 200 IU/mL interleukin-2 (IL-2; Roche), and 100 ng/mL α -GalCer (Enzo Life Science). B cells depleted from PBMCs and negatively purified B cells were cultured in custom-made Yssel medium containing 1% human serum AB.²³

Antibodies and flow cytometry

Dyes used were: Viability Dye efluor450, Viability Dye efluor786, and Viability Dye efluor506 (eBioscience), and Live/Dead Blue UV (Invitrogen). Antibodies used were: anti-CD3, CD4, CD8, CD19, CD27, immunoglobulin D (IgD), IgM, CD1d, CD23, CD21, CD14, CD16, CD3, CD56, HLA-DR, CD19, CD20, CD27, IgM (BD Biosciences, San Jose, CA), iTCR (Miltenyi Biotec), CD45 (Beckman Coulter), and CD1c (Ozyme).

We analyzed $\geq 5 \times 10^5$ cells. The limit of detection of iNKT cells was defined as <40 cells. The gating strategy of B-cell subset analysis is depicted in supplemental Figure 2. Data were acquired using a FACSCanto II or LSRFortessa (BD Biosciences), and the data were analyzed using FlowJo X (TreeStar).

Statistical analysis

The Mann-Whitney nonparametric 2-tailed test was used to compare 2 unpaired variables (percentages of iNKT, B cells, and B-cell subsets). The Kruskal-Wallis nonparametric 2-tailed test was used to compare more than 2 unpaired variables (percentages of iNKT subsets and mean fluorescence intensity [MFI] of CD1d). Comparisons of paired variables (percentages of iNKT cells between D0 and D12, % iNKT detected using iTCR or CD1d tetramers, and % iNKT detected using extracellular staining only or intra- and extracellular staining) were performed using the nonparametric 2-tailed Wilcoxon test. The Pearson correlation test was used to evaluate the correlations between individual indicators (percentage of iNKT D0/D12 and of iNKT/MZ B cells). All statistical analyses were performed using Prism 5 software (Graph Pad Software). *P* values < .05 indicate statistical significance.

Study approval

Blood samples were obtained after acquiring the patient's informed consent, in accordance with Institutional Guidelines and the Declaration of Helsinki. The study complied with the human experimentation guidelines of Pitié-Salpêtrière Hospital.

Results

The frequencies of iNKT cells in blood and spleen are decreased in patients with HHV-8 MCD

iNKT cells are characterized by the coexpression of CD3 and iTCR. CD1d tetramers specifically identify iNKT cells, allowing us to confirm that in HDs, CD3⁺iTCR⁺ cells represented all iNKT cells (supplemental Figure 3A).

We analyzed the frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 29 HDs, 21 patients infected with HHV-8 with KS, and 25 patients with HHV-8 MCD. Patients with HHV-8 MCD, irrespective of their HIV status, had similarly reduced frequencies of iNKTs in their PBMCs compared with those of patients with KS (*P* = .0006 and .0008, respectively) and HDs (*P* < .0001 and < .0001, respectively) (Figure 1A), and there was no difference between the frequencies of iNKT cells of patients with KS and HDs. Similarly, the frequencies of iNKT spleen cells from 7 patients with HHV-8 MCD were significantly lower compared with those of 8 HDs (*P* = .009) (Figure 1B). The frequencies of iNKT cells did not differ significantly after analyzing the expression of extracellular or intracellular iTCR of the 3 groups, indicating that the reduced

Table 1. Patient and subject characteristics

| Patients/subjects and diagnoses | | n | Male/female (n) | Age, y (quartiles) | CD4 cell count, cells/mm ³ (quartiles) | HHV-8 DNA, log ₁₀ copies/10 ⁶ cells (quartiles) | HIV RNA, log ₁₀ copies/mL (quartiles) |
|---------------------------------|----------------------|----|-----------------|--------------------|---|---|--|
| MCD patients | HIV ⁻ MCD | 8 | 7/1 | 68.5 (61-84)* | 562 (405-2117) | 5 (2.5-5.75) | NR |
| | HIV ⁺ MCD | 24 | 19/5 | 45.5 (33.5-51) | 307 (130-500)† | 5.7 (3.75-6.48) | 1.44 (<1.3-2.75) |
| KS patients | HIV ⁻ KS | 11 | 10/1 | 62 (57-73)* | 576 (416-906.3) | <2 | NR |
| | HIV ⁺ KS | 13 | 11/2 | 40 (35.5-49) | 337 (120-449)† | <2 | 2.045 (<1.6-4.8) |
| HDs | — | 29 | 14/15 | 28 (25-41) | — | NR | NR |

Data are median (quartiles) values. No significant differences were found for ages between patients HIV⁻ with MCD and with KS and for CD4 T-cell counts between patients HIV⁺ with MCD and with KS. Significant $P < .05$, Mann-Whitney test.

NR, not relevant.

* $P = .26$.

† $P = .9$.

frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD were not explained by internalization of the iTCR (supplemental Figure 3B). The results of reverse transcriptase polymerase chain reaction assays of the levels of messenger RNAs encoding the V α 24 and V β 11 chains of the iNKT TCR confirmed the flow cytometry findings (supplemental Figure 3C).

Despite the low but similar CD4⁺ T-cell counts in both populations ($P = .9$) (Table 1), the frequency of iNKT cells in patients with HIV⁺ MCD was significantly lower compared with that of patients with HIV⁺ KS ($P = .002$, supplemental Figure 4A). Further, despite the similar advanced ages of both groups ($P = .3$) (Table 1), the frequency of iNKT cells in patients with HIV⁻ HHV-8 MCD patients was significantly lower compared with that of patients with HIV⁻ KS ($P = .003$) (supplemental Figure 4B). Moreover, this decrease was not related to cell death during HHV-8 MCD flares, because it was also observed during remission (median, 23 months; range, 3-48 months) (supplemental Table 1) and was not associated with HHV-8 or HIV replication or with the administration of rituximab (supplemental Figure 5A-D).

Together, these findings confirm that patients with HHV-8 MCD harbor a quantitative defect in iNKT cells compared with patients with KS as well as HDs.

Decreased frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD are associated with modifications of iNKT cell subsets

We analyzed the distributions of iNKT cell subsets (CD4⁺, CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ [double-negative, DN], and CD4⁺CD8⁺ (double-positive) in patients with HHV-8 MCD compared with those of HDs (Figure 1C). We conducted separate analyses of these 2 subgroups of patients because HHV-8 MCD might occur during immunosuppression associated with HIV infection or in elderly HIV⁻ patients. The iNKT cells of HDs were mainly DN with similar proportions of CD4⁺ and CD8⁺ iNKT cells. Compared with HDs, HIV⁻ patients with HHV-8 MCD exhibited a significant decrease in DN-iNKT cells ($P = .04$) and higher proportions of CD4⁺ and CD8⁺ iNKT cells (Figure 1C). In contrast, HIV⁺ patients with HHV-8 MCD exhibited significant decreases in CD4⁺ ($P = .04$) and DN-iNKT cells ($P = .003$), whereas the CD8⁺ iNKT-cell subset was proportionally increased ($P = .008$).

Proliferative capacity of iNKT cells is impaired in patients with HHV-8 MCD

We compared the proliferative capacity of iNKT cells from patients and controls. The iNKT cells from HIV⁺ and HIV⁻ patients with HHV-8 MCD failed to expand in vitro in response to α -GalCer and IL-2, in contrast to those from HDs and patients with KS (Figure 2A). The proportion of iNKT cells in HDs and

patients with KS significantly increased ($P = .001$ and $.004$, respectively) between days 0 and 12. Further, there was no significant difference between the frequencies of iNKT cells from HDs and those of patients with KS on day 12 ($P = .42$). The results were similar for spleen cells (data not shown).

The frequencies of iNKT cells obtained on day 12 of culture did not correlate with their frequencies on day 0 in patients with KS and HDs ($r = 0.24$, $P = .28$) or with HHV-8 MCD ($r = -0.09$, $P = .75$) (Figure 2B), demonstrating that the failure of iNKT cells to proliferate in patients with HHV-8 MCD was not associated with the decreased number of cells. To go further, we depleted iNKT cells from healthy PBMCs, and the frequencies of iNKT cells were similar to those of patients with HHV-8 MCD. On culture day 12 of these iNKT-depleted PBMCs, there was a significant increase in iNKT cells ($P = .0078$), similar to that of healthy unmanipulated PBMCs (Figure 2C).

IL-15 is a key factor that contributes to iNKT cell activation and proliferation²⁴; therefore, we found that in vitro IL-15 did not expand or rescue the selective defect in iNKT cells (data not shown). Together, these results show a proliferative defect in vitro of iNKT cells from patients with HHV-8 MCD that was independent of their decreased frequencies in vivo.

iNKT cell defects are not associated with an altered expression of CD1d on the surface of APCs from patients with HHV-8 MCD

The proliferation and homeostasis of iNKT cells depend on the expression of CD1d by antigen-presenting cells (APCs),^{25,26} and the lytic HHV-8 replication cycle may promote downregulation of CD1d on the surface of infected cells.²⁷ Therefore, we analyzed CD1d expression on B cells and monocytes from HDs and from patients with KS or HHV-8 MCD. The MFI values of CD1d on B cells and classical monocytes were similar among groups (Figure 3A).

B cells play a pivotal role in maintaining iNKT cell homeostasis with a differential expression of CD1d on B-cell subsets and MZ B cells that express the highest levels of CD1d^{25,28}; therefore, we determined the levels of CD1d in the blood and splenic B-cell subsets. There was no significant difference in CD1d expression between all B-cell subsets from HDs and patients with KS or HHV-8 MCD (Figure 3B). Similarly, there was no significant difference in the expression of CD1d by SMCs of each patient group, except for CD27⁻ memory B cells (supplemental Figure 6).

iNKT cell defects in patients with HHV-8 MCD are associated with a decrease in circulating and splenic MZ B cells

The analysis of B-cell subsets in the PBMCs from 22 HDs, 18 patients with KS, and 17 patients with HHV-8 MCD (Figure 4A) revealed a

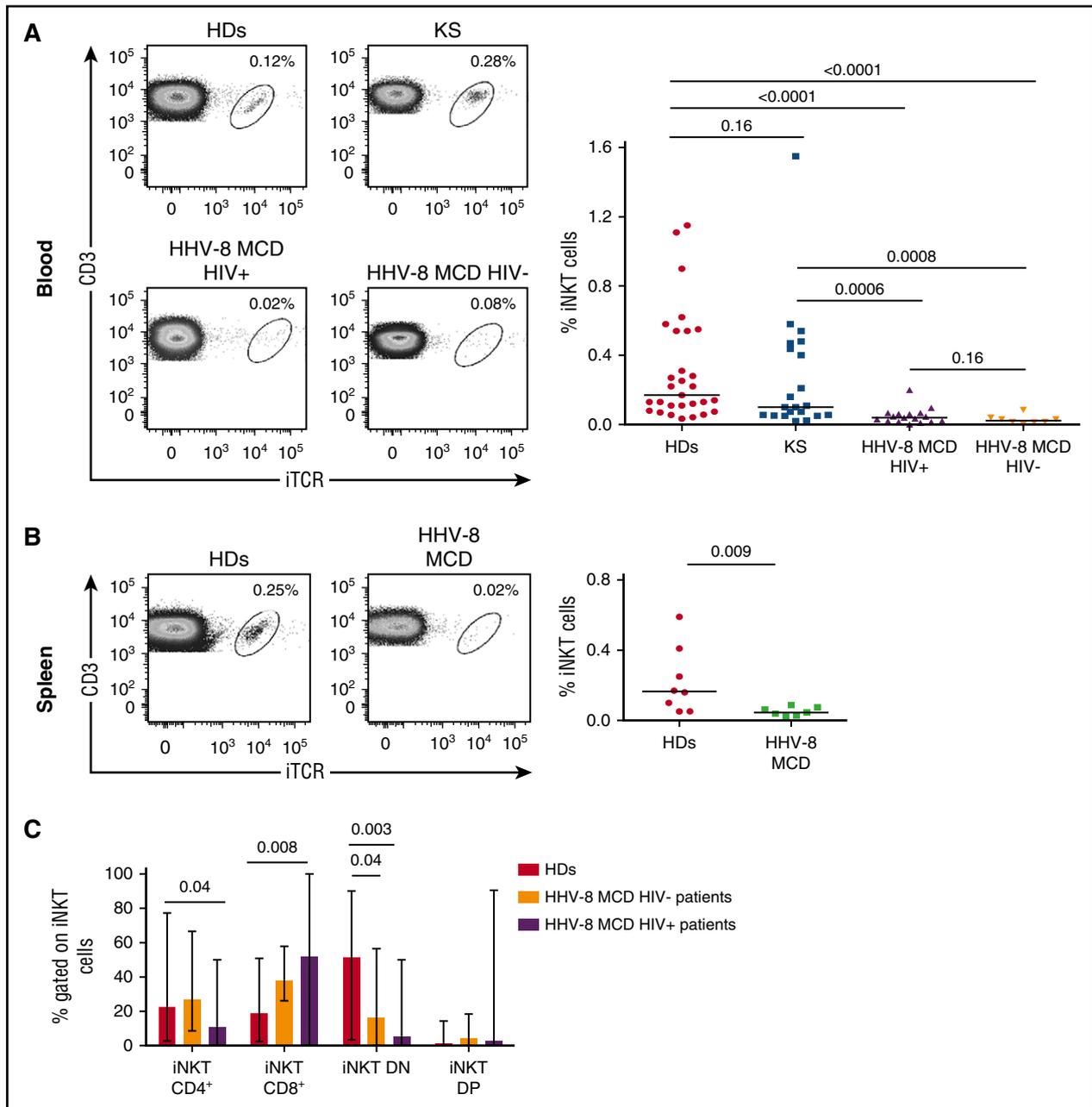


Figure 1. The frequencies of iNKT cells in blood and spleen are decreased in patients with HHV-8 MCD. PBMCs and SMCs from controls (HDs and patients with KS) or patients with HHV-8 MCD were stained ex vivo for surface expression of CD3, iTCR mAbs, CD4, and CD8. (A) Representative flow cytometry plot and cumulative data showing frequencies and median of iNKT cells in the PBMCs of 29 HDs, 21 KS patients, and 25 patients with HHV-8 MCD (17 HIV⁺ and 8 HIV⁻). Significant $P < .05$, Mann-Whitney test. (B) Representative flow cytometry plot and cumulative data showing frequencies and median of iNKT cells in the SMCs of 8 HDs and 7 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < .05$, Mann-Whitney test. (C) Cumulative data showing frequencies and median of iNKT cell subsets (ie, CD4⁺, CD8⁺, CD4⁻CD8⁻ (DN), and CD4⁺CD8⁺ (double positive [DP])) in the PBMCs of 27 HDs, 6 patients with HHV-8 MCD HIV⁻, and 10 patients with HHV-8 MCD HIV⁺. Significant $P < .05$, Mann-Whitney test.

decrease in the frequency of circulating MZ B cells from patients with HHV-8 MCD, treated with rituximab or not, compared with patients with KS ($P = .0015$ and $<.0001$, respectively) and HDs ($P = .0007$ and $<.0001$, respectively). This defect was associated with a significant decline of switched memory peripheral B cells of patients with HHV-8 MCD, independent of rituximab treatment, compared with patients with KS ($P = .01$ and $.0003$, respectively) and HDs ($P = .04$ and $.0004$, respectively). Note that rituximab treatment was distant to evaluation in most cases (median >1 year).

Further, the frequency of splenic MZ B cells from patients with HHV-8 MCD was significantly decreased compared with that of HDs ($P = .009$) (Figure 4B), demonstrating that this defect was not caused by sequestration of MZ B cells in the spleen. Moreover, there was a significant positive correlation between the frequencies of iNKT and MZ B cells ($r = 0.51$, $P < .001$) and between those of iNKT and switched B cells ($r = 0.35$, $P = .008$) (Figure 4C) in the blood of HDs and patients with KS and HHV-8 MCD. Together, these findings indicate that HHV-8 MCD is associated with a combined deficit in the populations of iNKT and MZ B cells in blood and spleen.

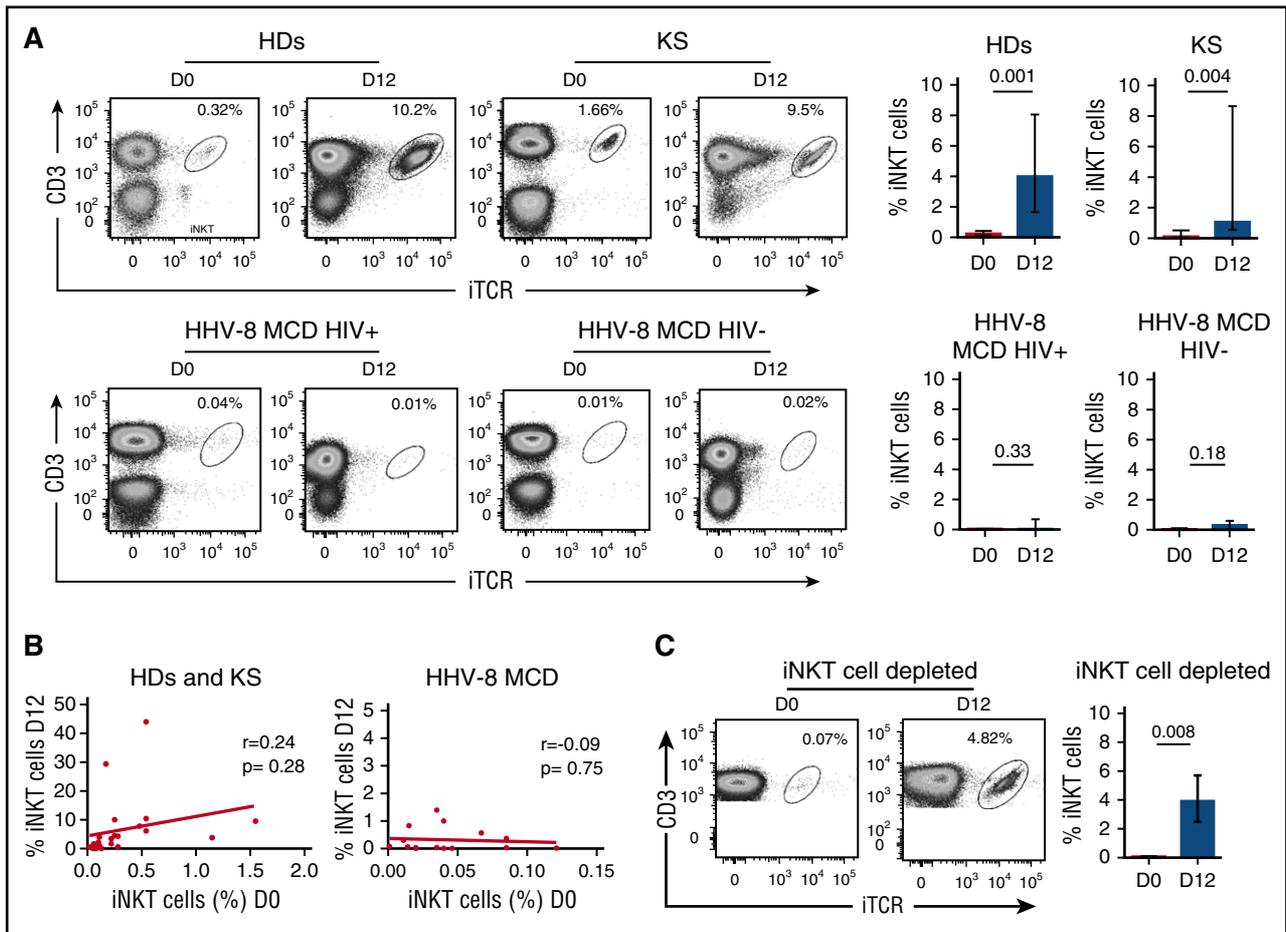


Figure 2. The proliferative capacity of iNKT cells is impaired in patients with HHV-8 MCD. PBMCs were cultured with α -GalCer and IL-2 for 12 days. Cells were stained with CD3 and iTCR mAbs. (A) Representative flow cytometry plots and bar chart show cumulative data from 13 HDs, 9 patients with KS, and 15 patients with HHV-8 MCD (HIV⁺, n = 10; HIV⁻, n = 5) showing frequencies of iNKT cells before and after α -GalCer and IL-2 stimulation. Bar chart shows cumulative data as frequencies and median \pm interquartile ranges. Significant $P < .05$, Wilcoxon matched pairs test. (B) Correlation plots show the relationship between frequencies of iNKT cells at day 0 (D0) and D12 after α -GalCer and IL-2 stimulation. Significant $P < .05$, Spearman's correlation. (C) Representative flow cytometry plots showing frequencies of iNKT cells at D0 and D12 in iNKT cell-depleted PBMCs from 8 HDs. Bar chart shows cumulative data as median \pm interquartile ranges. Significant $P < .05$, Wilcoxon matched pairs test.

Normal B cells do not rescue the impaired proliferation of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD

iNKT and B cells cooperate to their respective development and homeostasis.^{25,29-33} We analyzed the capacity of B cells isolated from patients with HHV-8 MCD to cause the dysfunction of iNKT cells, because HHV-8 MCD is characterized by severe abnormalities of B cells. We assessed the proliferative response of iNKT cells present in PBMCs from HDs to α -GalCer and IL-2. The B cells in these PBMC cultures were replaced with negatively purified allogeneic B cells isolated from patients with HHV-8 MCD (healthy PBMC^{-B cells} + MCD B cells). Conversely, B cell-depleted PBMCs from patients with HHV-8 MCD and reconstituted with allogeneic B cells isolated from HDs were treated with α -GalCer and IL-2 to determine the proliferative response of iNKT cells (Figure 5A).

Replacing the B cells in cultures of PBMCs isolated from HDs with HHV-8 MCD B cells did not reduce the expansion of the iNKT cells (Figure 5B). Similarly, replacing the B cells in cultures of PBMCs from patients with HHV-8 MCD with healthy B cells did not rescue the diminished proliferation of iNKT cells (Figure 5B). Moreover, depletion of B cells from PBMCs from HDs did not affect the proliferation of iNKT cells treated with α -GalCer and IL-2. Together, these results

indicate that B cells do not mediate iNKT cell dysfunction in patients with HHV-8 MCD.

iNKT cells are required to maintain CD27⁺IgD^{+/-} memory B cells in culture

We used the same experimental protocol to assess the effects of proliferation-defective iNKT cells on the abnormalities of B cells that occur in patients with HHV-8 MCD. For this purpose, we determined the capacity of iNKT cells treated with α -GalCer and IL-2 to sustain the expansion of the populations of CD27⁺IgD⁺ and CD27⁺IgD⁻ memory B cells in vitro.

Cultures of unmanipulated PBMCs from HDs or those depleted of B cells and reconstituted with autologous or allogeneic B cells maintained their populations of CD27⁺IgD⁺ and CD27⁺IgD⁻ memory B cells (frequencies between 15.4%-27.7% and 1.5%-29.2%, respectively) (Figure 6). In contrast, in B cell-depleted cultures of PBMCs from patients with HHV-8 MCD and reconstituted with B cells from HDs and treatment with α -GalCer and IL-2 did not maintain the population of memory B cells; thus, the frequencies of CD27⁺IgD⁺ and CD27⁺IgD⁻ memory B cells at the end of the cultures were <5% and <10%, respectively. Similarly, treatment of

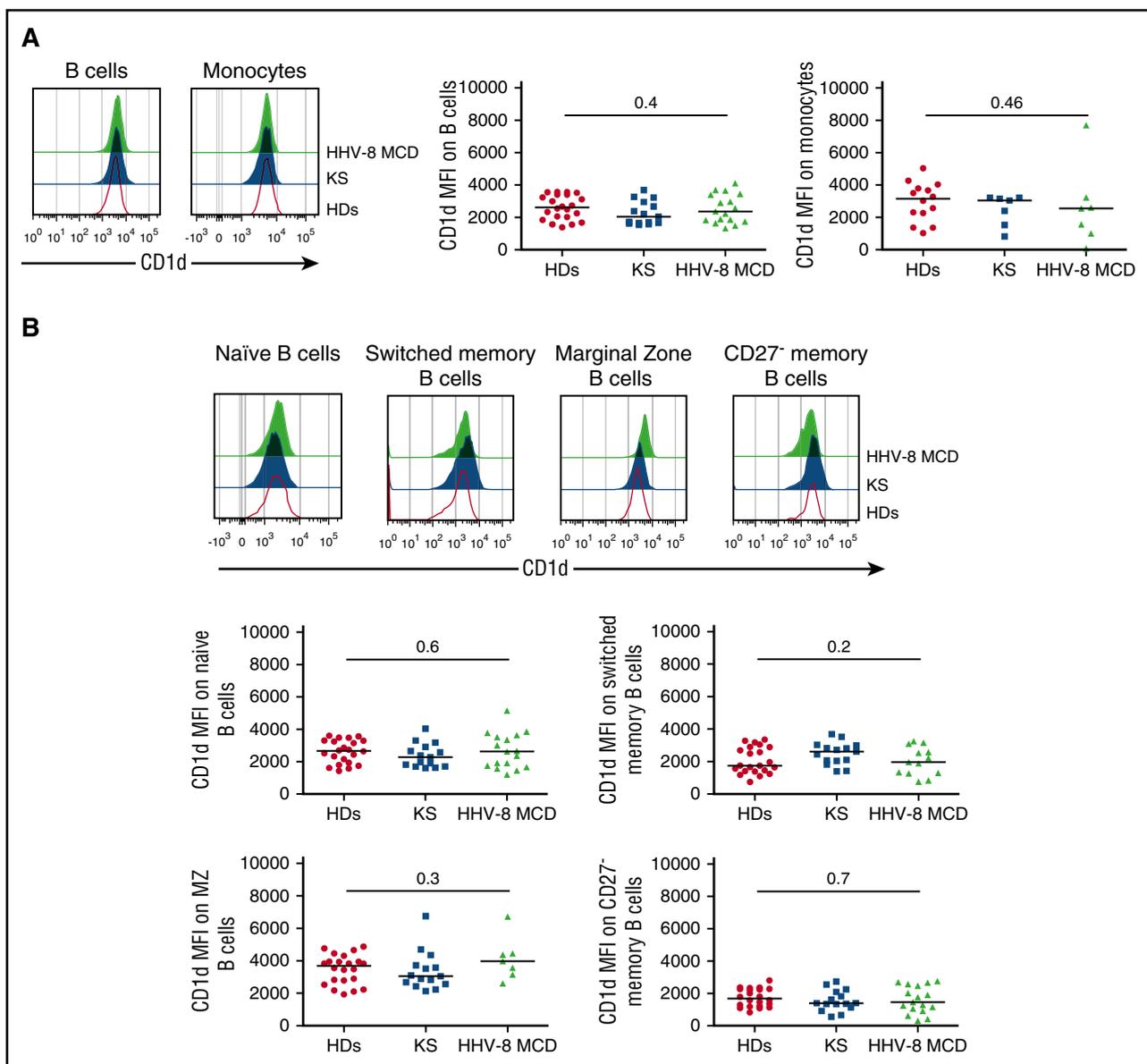


Figure 3. iNKT cell defects are not associated with an alteration of the expression of CD1d on the surface of APCs from patients with HHV-8 MCD. PBMCs from controls (HDs and patients with KS) or patients with HHV-8 MCD were surface stained with CD19 to identify B cells, CD14 and HLA-DR to identify monocytes, and CD27, IgD, IgM, CD21, CD23, CD1d, and CD1c to identify B-cell subsets. (A) Representative histograms showing surface expression of CD1d on CD19⁺ B cells and CD14⁺ monocytes from HDs, patients with KS, and patients with HHV-8 MCD. Scatter plots showing MFI and median of CD1d on B cells from 22 HDs, 15 patients with KS, and 17 patients with HHV-8 MCD, and monocytes from 14 HDs, 7 patients with KS, and 7 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < .05$, Kruskal-Wallis test. (B) Representative histograms displaying CD1d expression on naïve, switched memory, marginal zone, and CD27⁻ memory CD19⁺ B cells in the PBMCs of HDs, patients with KS, and patients with HHV-8 MCD. Scatter plots showing MFI and median of CD1d in each subpopulation of B cells in 22 HDs, 15 patients with KS, and 17 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < .05$, Kruskal-Wallis test.

PBMCs from patients with HHV-8 MCD did not sustain the expansion of CD27⁺IgD⁺ and CD27⁺IgD⁻ memory B cells (0.5%-5.2% and 0%-1.5%, respectively).

However, in B cell-depleted cultures of PBMCs from HDs, which were reconstituted with B cells from patients with HHV-8 MCD, treatment with α -GalCer and IL-2 increased the populations of CD27⁺IgD⁺ and CD27⁺IgD⁻ memory B cells (39.5% and 8.9% and 1.77% and 13.9%, respectively) compared with cultures of PBMCs from patients with HHV-8 MCD. Residual normal B cells did not cause this increase, because B cells were not detected in B cell-depleted cultures of PBMCs isolated from HDs (supplemental Figure 7). Together, these results suggest that

iNKT cells are required to maintain and expand the population of memory B cells.

Discussion

The population of iNKT cells is an important component of the immune response to herpesviruses, particularly in patients with primary immunodeficiencies.^{17,19,34} Moreover, primary infection by HHV-8 of an EBV⁻ child with an XLP-1 phenotype and a complete absence of iNKT cells was associated with the development of an HHV-8-driven

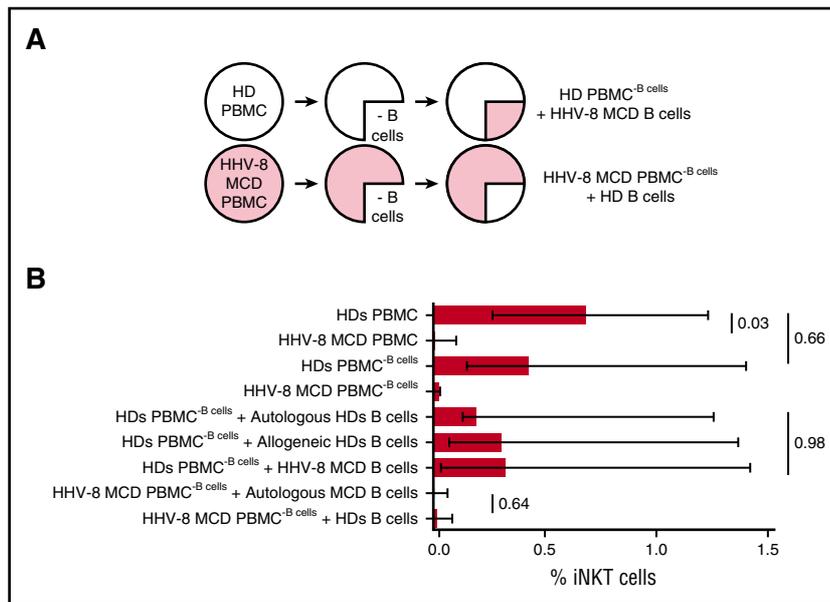


Figure 5. Normal B cells do not rescue the impaired proliferation of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD. (A) Experimental design. B cells from HDs were isolated by negative selection, cocultured with allogeneic B cell-depleted PBMCs from patients with HHV-8 MCD, and stimulated for 7 days with α -GalCer and IL-2. Alternatively, negative isolated B cells from patients with HHV-8 MCD were cultured with allogeneic B cell-depleted PBMCs from HDs. As controls, B cells from HDs were cultured with allogeneic and autologous B cell-depleted PBMCs from HDs; B cells from patients with HHV-8 MCD were cultured with autologous B cell-depleted PBMCs derived from patients with HHV-8 MCD. Cells were stained with CD3 and iTCR mAbs to identify iNKT cells. (B) Bar chart shows cumulative data as frequencies and median \pm interquartile ranges of iNKT cells at day 7 in the PBMCs of 6 HDs and 3 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < .05$, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests.

lymphoproliferative disorder resembling HHV-8 MCD.³⁵ These observations prompted us to analyze the frequency and function of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD. Our results convincingly support the conclusion that these patients, regardless of HIV status, are characterized by a profound decrease in the frequencies and functional activities of iNKT cells.

The heterogeneous distribution of iNKT cells and their decreased number in the circulation might reflect altered tissue redistribution; however, the percentage of iNKT cells was significantly decreased in SMCs from patients with HHV-8 MCD. Moreover, deficiencies in iNKT cells occur during flares and remission, which likely reflect a persistent abnormality of iNKT cell homeostasis, in contrast to the migration of iNKT cells to sites of inflammation during flares.

This significant quantitative deficit was accompanied by a significant defective proliferation of the residual iNKT cells after treatment with α -GalCer and IL-2, which was not reversible by exogenous IL-15, a key contributor to iNKT activation and proliferation.²⁴

Although mature iNKT cells do not require continued interactions with CD1d in the periphery to maintain homeostatic proliferation,^{36,37} B cells of patients with systemic lupus erythematosus support iNKT cell homeostasis through the presentation of lipid antigens.²⁵ The HHV-8 MIR1/2 proteins downregulate CD1d expression at the surface of infected cells, leading to their lack of recognition by iNKT cells and subsequent escape from immune surveillance.²⁷ We hypothesized that the defects of iNKT cells may be explained by altered interactions with APCs; therefore, we analyzed the CD1d expression by APCs, specifically B cells and monocytes, from patients with HHV-8 MCD and did not detect a significant difference. However, the number of cells available was insufficient to determine the expression of CD1d on DCs and nonclassical monocytes. HHV-8-infected B cells likely represent a very small proportion of circulating B cells, and we therefore cannot exclude the possibility that CD1d expression may be decreased in HHV-8-infected B cells.

We reveal a profound alteration in the distribution of B-cell subsets in patients with HHV-8 MCD, reflected by a significant decrease in memory B cells, particularly MZ B cells. It is important to consider critical observations required to interpret these results. First, the pathogenesis of HHV-8 MCD is associated only during flares, with IL-6 overproduction.⁴ Second, the therapeutic monoclonal antibody (mAb) rituximab, which specifically targets B cells and is

widely used to treat HHV-8 MCD, induces a complete, albeit transient, depletion of B cells. Evidence indicates that after B-cell reconstitution, the distribution of B-cell subsets may vary depending on the disease.³⁸⁻⁴¹ However, the deficit in memory B cells that occurs in patients with HHV-8 MCD is evident during flares and remission, before rituximab treatment as well as after B-cell reconstitution. Thus, the pronounced abnormalities of B-cell subsets in HHV-8 MCD are not caused by IL-6 overproduction or treatment with rituximab.

There is a significant positive correlation between the decreased frequencies of iNKT and MZ B cells observed in patients and HDs; these cells cooperate to mediate their respective development.^{25,29-33} Therefore, we analyzed the relationship between these cell types in coculture experiments. We observed that normal B cells did not rescue iNKT cell proliferation in PBMCs from patients with HHV-8 MCD, supporting the conclusion that they likely are not directly involved in the events leading to the deficiency of iNKT cells. In contrast, we show that iNKT cells were required to maintain CD27⁺IgD^{+/+} memory B cells in culture. These results indicate that the functional defect of iNKT cells is not explained by abnormalities of the B-cell subset but instead may contribute to the anomalous decrease in memory and MZ B cells in patients with HHV-8 MCD. Although the possibility that iNKT and B-cell defects involve a third partner, particularly DCs, cannot be excluded, our results are consistent with recent evidence that iNKT cells induce the expansion of unswitched memory CD27⁺IgD⁺ B cells in vitro.⁴²

HHV-8 MCD and KS occur most frequently in HIV-immunocompromised patients^{7,43} or in not otherwise immunocompromised elderly people who are not infected with HIV.³ Age and HIV infection are associated with a decline in iNKT cells and likely contribute to the defects observed in the present study. Moreover, the overall modifications of iNKT cell subsets observed in patients with HHV-8 MCD are consistent with those associated with advanced age or HIV infection of patients without MCD.^{20,21} CD8⁺ iNKT cells secrete high levels of IFN- γ , but the function of these cells during viral infection is not clearly characterized.⁴⁴ It cannot be ruled out, however, that the increase of the proportion of CD8⁺ iNKT cells reflect their antiviral activities in these HHV-8-infected patients.

Although the age-related decline of iNKT cell counts is likely not systematic, because HDs >75 years of age have similar median levels of iNKT cells compared with younger persons (D. Sauce, Sorbonne

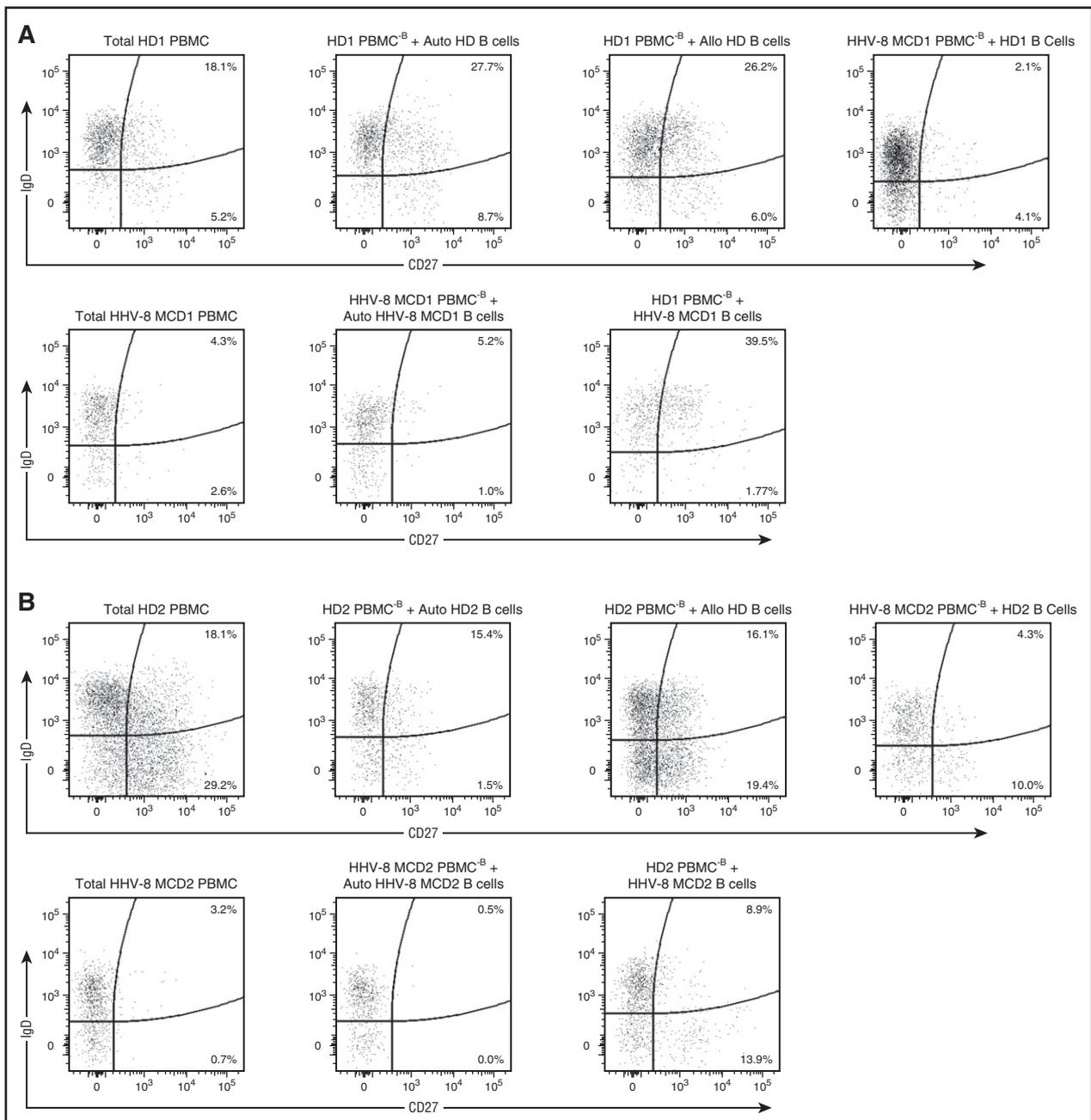


Figure 6. iNKT cells are required to maintain CD27⁺ IgD^{+/−} memory B cells in culture. B cells from HDs were isolated by negative selection, cocultured with allogeneic B cell-depleted PBMCs from patients with HHV-8 MCD, and stimulated for 7 days with α -GalCer and IL-2. Alternatively, negative isolated B cells from patients with HHV-8 MCD were cultured with allogeneic B cell-depleted PBMCs from HDs. As controls, B cells from HDs were cultured with allogeneic and autologous B cell-depleted PBMCs from HDs and B cells from patients with HHV-8 MCD were cultured with autologous B cell-depleted PBMCs derived from patients with HHV-8 MCD. Cells were stained with CD19, CD20, CD27, IgD, and IgM to identify B-cell subsets. Representative flow cytometry plots of B-cell analysis showing the frequencies of CD27⁺ IgD⁺ and CD27⁺ IgD⁻ B cells at day 7 from HDs and patients with HHV-8 MCD in 2 independent experiments, HD1/HHV-8 MCD1 (A) and HD2/HHV-8 MCD2 (B).

Université, Université Pierre et Marie Curie, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, INSERM U1135, oral communication, 28 June 2016), the analysis of larger number of patients report a global decline of iNKT cell with age.⁴⁵ The mechanism of this decline observed in the elderly is unknown and may reflect exhaustion of thymic output or increased sensitivity of iNKT cells to apoptosis.

In HIV-infected patients, the number of iNKT cells is decreased, particularly the number of CD4⁺ iNKT cells. This deficit is variably restored after antiretroviral therapy,⁴⁶ which is consistent with findings

that HHV-8 MCD may relapse in HIV⁺ patients despite apparently effective immunovirological control under antiretroviral therapy.⁷ During the natural course of the disease, persistent antigen exposure, microbial translocation, and increasing immune activation may lead to “immune exhaustion,” which leads to the progressive loss of the functions of lymphocyte subsets. In this regard, iNKT cells from HIV-infected patients express high levels of programmed death-1 (PD-1).⁴⁶ Similarly, in patients with systemic lupus erythematosus, iNKT cells that fail to proliferate express increased levels of PD-1, which is characteristic of an anergic or exhausted phenotype.^{47,48}

However, in the present study, the decrease in iNKT cells in patients with HHV-8 MCD was independent of age, HIV status, CD4 T-cell count, exposure to rituximab, or the time of sample acquisition (flare or remission). Whether age, HIV status, or both contribute to the iNKT cell defects observed here, our results demonstrate that they are constantly and particularly profound only in the context of HHV-8 MCD. These findings therefore support the hypothesis that a deficiency in iNKT cells contributes to the pathogenesis of HHV-8 MCD.

Nonetheless, several patients with KS presented very low numbers of circulating iNKT cells, consistent with the wide variations of circulating iNKT frequencies,⁴⁹ although they did not exhibit any clinical signs of HHV-8 MCD. Further, the numbers of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD in remission were near the limit of detection, suggesting that an iNKT cell defect alone may be insufficient to account for the pathogenesis of HHV-8 MCD.

These observations notwithstanding, our results demonstrate that iNKT cells are important contributors to the complex interaction between HHV-8 and immune cells and that their dysfunction may contribute to the development of HHV-8–related B-cell malignancies in HHV-8–infected patients.

Acknowledgments

The authors thank the Flow Cytometry Plateforme CyPs for their support in flow cytometry, Mathilde Ban for technical assistance,

Jehane Fadlallah and Laurence Gerard for patient information, Morgane Griesbeck for technical advice, Hans Yssel for providing Yssel medium and for critical and constructive reading, Rima Zorob and Véronique Morin for technical assistance with reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis and comments, and Enago (www.enago.com) for the English language review. The authors also thank the patients who participated in the study.

This work was supported by grants from the French National Agency for Research on AIDS and Viral Hepatitis by a scholarship from the Association pour la Recherche contre le Cancer (A.D.).

Authorship

Contribution: Z.S., A.D., E.O., and G.C. designed the study; Z.S., A.D., B.A., and G.C. wrote the manuscript; G.C., A.D., E.O., L.G., D.B., C.F., and N.D. selected patients; Z.S., A.E., and B.H. performed immunological assays; F.A. and A.-G.M. supervised the virological assays; Z.S., C.P., and G.C. supervised the cytometric analysis; Z.S. and G.C. performed the statistical analysis; and Z.S. and A.O. performed reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Guislaine Carcelain, Département d'immunologie, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 83 bd de l'Hôpital, 75013 Paris, France; e-mail: guislaine.carcelain@aphp.fr.

References

- Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, et al. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*. 1994;266(5192):1865-1869.
- Soulier J, Grollet L, Oksenhendler E, et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood*. 1995;86(4):1276-1280.
- Dossier A, Meignin V, Fieschi C, Boutboul D, Oksenhendler E, Galicier L. Human herpesvirus 8-related Castlemans disease in the absence of HIV infection. *Clin Infect Dis*. 2013;56(6):833-842.
- Oksenhendler E, Carcelain G, Aoki Y, et al. High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemans disease in HIV-infected patients. *Blood*. 2000;96(6):2069-2073.
- Du MQ, Liu H, Diss TC, et al. Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castlemans disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood*. 2001;97(7):2130-2136.
- Guihot A, Oksenhendler E, Galicier L, et al. Multicentric Castlemans disease is associated with polyfunctional effector memory HHV-8-specific CD8+ T cells. *Blood*. 2008;111(3):1387-1395.
- Powles T, Stebbing J, Bazeos A, et al. The role of immune suppression and HHV-8 in the increasing incidence of HIV-associated multicentric Castlemans disease. *Ann Oncol*. 2009;20(4):775-779.
- Diana J, Lehuen A. NKT cells: friend or foe during viral infections? *Eur J Immunol*. 2009;39(12):3283-3291.
- Levy O, Orange JS, Hibberd P, et al. Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis*. 2003;188(7):948-953.
- Banovic T, Yanilla M, Simmons R, et al. Disseminated varicella infection caused by varicella vaccine strain in a child with low invariant natural killer T cells and diminished CD1d expression. *J Infect Dis*. 2011;204(12):1893-1901.
- Nichols KE, Hom J, Gong SY, et al. Regulation of NKT cell development by SAP; the protein defective in XLP. *Nat Med*. 2005;11(3):340-345.
- Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, et al. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature*. 2006;444(7115):110-114.
- Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297-336.
- Brennan PJ, Brigl M, Brenner MB. Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(2):101-117.
- Carnaud C, Lee D, Donnars O, et al. Cutting edge: cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells. *J Immunol*. 1999;163(9):4647-4650.
- Fujii S, Shimizu K, Smith C, Bonifaz L, Steinman RM. Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein. *J Exp Med*. 2003;198(2):267-279.
- Latour S. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2007;7(6):510-514.
- Veillette A, Pérez-Quintero LA, Latour S. X-linked lymphoproliferative syndromes and related autosomal recessive disorders. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2013;13(6):614-622.
- Chung BK, Tsai K, Allan LL, et al. Innate immune control of EBV-infected B cells by invariant natural killer T cells. *Blood*. 2013;122(15):2600-2608.
- Peralbo E, Alonso C, Solana R. Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol*. 2007;42(8):703-708.
- Sandberg JK, Fast NM, Palacios EH, et al. Selective loss of innate CD4(+) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection. *J Virol*. 2002;76(15):7528-7534.
- Giffin L, Damania B. KSHV: pathways to tumorigenesis and persistent infection. *Adv Virus Res*. 2014;88:111-159.
- Yssel H, De Vries JE, Koken M, Van Blitterswijk W, Spits H. Serum-free medium for generation and propagation of functional human cytotoxic and helper T cell clones. *J Immunol Methods*. 1984;72(1):219-227.
- Matsuda JL, Gapin L, Sidobre S, et al. Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol*. 2002;3(10):966-974.
- Bosma A, Abdel-Gadir A, Isenberg DA, Jury EC, Mauri C. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity*. 2012;36(3):477-490.
- Bezbradica JS, Stanic AK, Matsuki N, et al. Distinct roles of dendritic cells and B cells in Va14Ja18 natural T cell activation in vivo. *J Immunol*. 2005;174(8):4696-4705.
- Sanchez DJ, Gumperz JE, Ganem D. Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. *J Clin Invest*. 2005;115(5):1369-1378.
- Bialecki E, Paget C, Fontaine J, Capron M, Trottein F, Faveeuw C. Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol*. 2009;182(10):6105-6113.
- King IL, Fortier A, Tighe M, et al. Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol*. 2011;13(1):44-50.

30. Detre C, Keszei M, Garrido-Mesa N, et al. SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. *Blood*. 2012;120(1):122-129.
31. Galli G, Nuti S, Tavarini S, et al. Innate immune responses support adaptive immunity: NKT cells induce B cell activation. *Vaccine*. 2003;21(Suppl 2):S48-S54.
32. Galli G, Pittoni P, Tonti E, et al. Invariant NKT cells sustain specific B cell responses and memory. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104(10):3984-3989.
33. Chang PP, Barral P, Fitch J, et al. Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol*. 2011;13(1):35-43.
34. Pasquier B, Yin L, Fondanèche MC, et al. Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med*. 2005;201(5):695-701.
35. Pasic S, Cupic M, Lazarevic I. HHV-8-related hemophagocytic lymphohistiocytosis in a boy with XLP phenotype. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2012;34(6):467-471.
36. McNab FW, Berzins SP, Pellicci DG, et al. The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol*. 2005;175(6):3762-3768.
37. Slauenwhite D, Johnston B. Regulation of NKT Cell Localization in Homeostasis and Infection. *Front Immunol*. 2015;6:255.
38. Colucci M, Carsetti R, Cascioli S, et al. B cell reconstitution after rituximab treatment in idiopathic nephrotic syndrome. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(6):1811-1822.
39. Anolik JH, Barnard J, Cappione A, et al. Rituximab improves peripheral B cell abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 2004;50(11):3580-3590.
40. Roll P, Dörner T, Tony HP. Anti-CD20 therapy in patients with rheumatoid arthritis: predictors of response and B cell subset regeneration after repeated treatment. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1566-1575.
41. Saadoun D, Rosenzweig M, Landau D, Piette JC, Klatzmann D, Cacoub P. Restoration of peripheral immune homeostasis after rituximab in mixed cryoglobulinemia vasculitis. *Blood*. 2008;111(11):5334-5341.
42. Zeng SG, Ghnewa YG, O'Reilly VP, et al. Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol*. 2013;191(4):1666-1676.
43. Grulich AE, van Leeuwen MT, Falster MO, Vajdic CM. Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet*. 2007;370(9581):59-67.
44. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4-CD8 α -invariant natural killer T cells. *PLoS One*. 2011;6(12):e28648.
45. Molling JW, Kölgen W, van der Vliet HJ, et al. Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer*. 2005;116(1):87-93.
46. Moll M, Kuylensstierna C, Gonzalez VD, et al. Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2009;39(3):902-911.
47. Cho YN, Kee SJ, Kim TJ, et al. Mucosal-associated invariant T cell deficiency in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*. 2014;193(8):3891-3901.
48. Cho YN, Kee SJ, Lee SJ, et al. Numerical and functional deficiencies of natural killer T cells in systemic lupus erythematosus: their deficiency related to disease activity. *Rheumatology (Oxford)*. 2011;50(6):1054-1063.
49. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007;122(1):1-14.

Supplemental methods, tables and figures

iNKT and Memory B cells alterations in HHV-8 Multicentric Castleman Disease

SBIHI Z. et al.

Supplemental Methods

Supplemental Tables

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figures

Supplemental Methods

Reverse transcriptase (RT)-PCR analysis of iNKT cell receptor expression

Total RNA was extracted from total PBMCs of HDs and Patients with HHV-8 MCD, from purified iNKT cells and PBMCs^{iNKT} from HDs using RNAqueous kit (Ambion Inc., Austin, Texas, USA), according to the manufacturer's instructions, treated with DNase (Ambion), checked for purity on a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop-Technologies).

A total of 200ng RNA was subjected to the first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis using High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied-Biosystems, Life Technologies), according to the manufacturer's instructions, before being used in RT-PCR experiments.

Two microliters of diluted cDNA samples were added to 23 μ l reaction mixture containing 0.2U Taq DNA polymerase (Sigma-Aldrich) for PCR. The reaction conditions were optimized for each pair of primers.

The following gene-specific primers were used: RPS14 (5-AACCATCTGCCGTGTGACTGG-3) used as an endogenous control; TCR constant chain (TRBC2 gene) sense (5-CAGCGAGCCCTACTCAAATTAG-3) and antisense (5-GACCTGTGGAAGAGAGAACATT-3); TCR V α 24 (TRAV10 gene) sense (5-AAGCATCTGACGACCTTCTTG-3) and antisense (5-AACAGGACCTCTCCAGTATC-3); TCR V β 11 (TRBV25-1 gene) sense (5-GCACAGTTTGGGCTTTTATTTT-3); and antisense (5-GAGAACATTCCAGAGTGATCTTC-3) (Eurogentech). Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis.

Supplemental Figure Legends

Figure S1. iNKT and B cell purities pre- and post-magnetic purification. (A) iNKT cells were depleted from PBMCs using anti-iNKT beads (Miltenyi) based on their iTCR expression. Representative flow cytometry plots depicting the depletion. (B) B cells were purified using a negative B cell isolation kit (Miltenyi). Representative flow cytometry plots depicting the purities before and after purification.

Figure S2. Gating strategy of B cell subsets analysis. Representative flow cytometry plot showing CD19⁺ CD27⁻ IgD⁺ IgM⁺ (Naïve), CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ IgM⁻ (Switched memory), CD19⁺ CD27⁺ IgD^{low} IgM⁺ CD21^{hi} CD23⁻ CD1c^{hi} (marginal zone), CD19⁺ CD27⁻ IgD⁻ IgM⁻ (CD27⁻ memory) and CD19⁺ CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺ (IgM only) B cells in the PBMCs (A) and the SMCs (B) of HDs.

Figure S3. Detection of iNKT cells in peripheral blood. (A) Flow cytometry plot and comparative analysis of the iNKT cell frequencies detected using iTCR mAbs or α -GalCer loaded human CD1d tetramers. Significant $P < 0.05$, Wilcoxon test. (B) PBMCs from HDs, patients with KS and patients with HHV-8 MCD were stained for CD3 and iTCR extracellularly only (EC) or extra- and intra-cellularly (EC+IC). Representative flow cytometry plots and cumulative data showing iNKT cell percentages from 11 HDs, 4 patients with KS and 8 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Wilcoxon test. (C) Comparison of V α 24, V β 11 T cell mRNA expression in the PBMCs of HDs and patients with HHV-8 MCD. PBMCs from 3 HDs and from 3 patients with HHV-8 MCD, purified iNKT cells and PBMCs-iNKT from 1 HD were analyzed for the expression of V α 24, V β 11 (invariant T-cell receptor), and TCR constant chain by reverse transcriptase PCR. To assess RNA loading, RPS14 was measured in the same subjects. Messenger RNA from purified iNKT cells was used as a standard for expression of V α 24, V β 11 and TCR constant chain. Messenger RNA from PBMCs^{-iNKT} was used as a negative control for expression of V α 24 and V β 11. Results are representative of 3 independent experiments involving separate HDs and patients with HHV-8 MCD.

Figure S4. The decreased frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD are not associated with modifications of iNKT cells related to HIV infection or to age. PBMCs from patients with HHV-8 MCD were stained *ex vivo* for surface expression of CD3 and iTCR mAbs. (A) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in PBMCs samples from 12 HIV⁺ patients with KS and 17 HIV⁺ patients with HHV-8 MCD. (B) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 7 HIV⁻ patients with KS and 10 HIV⁻ patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Mann-Whitney test.

Figure S5. The decreased frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD are not associated with modifications of iNKT cells related to cell death during HHV-8

MCD flare, HHV-8 or HIV replications or to rituximab administration. PBMCs from patients with HHV-8 MCD were stained *ex vivo* for surface expression of CD3 and iTCR mAbs. (A) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 15 patients with HHV-8 MCD during flare and 9 patients with HHV-8 MCD during remission. (B) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 4 patients with HHV-8 MCD with HHV-8 viral load < 100cop and 13 patients with HHV-8 MCD with HHV-8 viral load > 100cop. (C) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 8 patients with HHV-8 MCD with undetectable HIV viral load and 13 patients with HHV-8 MCD with detectable HIV viral load. (D) Cumulative data showing frequencies of iNKT cells in the PBMCs of 10 patients with HHV-8 MCD receiving rituximab and 14 rituximab naïve patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Mann-Whitney test.

Figure S6. The iNKT cell defects are not associated with an alteration of the expression of CD1d on the surface of antigen-presenting cells (APCs) from spleen samples of patients with HHV-8 MCD. SMCs from HDs or patients with HHV-8 MCD were surface stained with CD19, CD27, IgD, IgM, CD21, CD23, CD1d and CD1c to identify B cell subsets. Representative histograms displaying CD1d expression on marginal zone, naïve, switched memory and CD27⁻ memory CD19⁺ B cells in the SMCs of HDs and patients with HHV-8 MCD. Bar chart showing MFI and median of CD1d in B cell subpopulations in the PBMCs of 6 HDs and 4 patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Kruskal-Wallis test.

Figure S7. Absence of B cells after 7 days of culture in B cells depleted PBMCs. PBMCs or B cells depleted PBMCs (PBMC^{-B} cells) were cultured with α -GalCer and IL-2 for 7 days. Cells were stained with CD19, CD20 detect B cells. Representative flow cytometry plots of B cell analysis and bar chart showing the frequencies of CD19⁺ CD20⁺ B cells at day 7 of PBMCs and B cells depleted PBMCs from HDs and patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Wilcoxon test.

Supplemental Tables

Supplemental Table 1: HHV-8 MCD patients' clinical data and laboratory characteristics.

| Patient | Age (years) | Gender | Sample | MCD status | CRP (mg/dL) | Time from last flare (months) | Treatment at the time of sample collection (days) | | Anti-CD20 | Time between anti CD20 exposure and sample collection (months) | | KS | HIV | HAART at the time of sample collection | CD4/mm3 | HIV RNA (log ₁₀ copies/mL) | HHV-8 DNA (log ₁₀ copies/10 ⁶ cells) |
|---------|-------------|--------|--------|------------|-------------|-------------------------------|---|-------------------------------|-----------|--|--|----|-----|--|---------|---------------------------------------|--|
| | | | | | | | Time from last flare (months) | Time from last flare (months) | | Time between anti CD20 exposure and sample collection (months) | Time between anti CD20 exposure and sample collection (months) | | | | | | |
| 1 | 87 | M | P | R | <5 | M24 | - | - | - | - | - | - | - | NR | 2117 | NR | 5.8 |
| 2 | 61 | M | P | A | 110 | M24 | Prednisone (D21) | - | - | - | - | - | - | NR | 562 | NR | 5.09 |
| 3 | 69 | M | P | A | 120 | M13 | Prednisone (D21) | - | - | - | - | - | - | NR | 190 | NR | 5.58 |
| 4 | 68 | M | P | R | <5 | M38 | Etoposide (D15) | + | M13 | - | - | - | - | NR | 405 | NR | 2.81 |
| 5 | 78 | M | P | R | <5 | M38 | - | + | M38 | - | - | - | - | NR | 745 | NR | <2 |
| 6 | 86 | F | P | A | 35 | M3 | - | + | M20 | - | - | - | - | NR | 542 | NR | 6.01 |
| 7 | 61 | M | P | A | 126 | M3 | - | + | M44 | - | - | - | - | NR | NA | NR | 7 |
| 8 | 58 | M | P | R | <5 | M22 | - | + | M22 | - | - | - | - | NR | 2278 | NR | 4.42 |
| 9 | 48 | F | P | R | <5 | M48 | Etoposide (D60) | - | - | - | - | - | - | + | 666 | <1.3 | 3.92 |
| 10 | 48 | F | P | A | 37 | M48 | - | - | - | - | - | - | - | + | 48 | <1.3 | 4.19 |
| 11 | 37 | M | P | R | <5 | M31 | Etoposide (D60) | - | - | - | - | - | - | + | 500 | <1.3 | <2 |
| 12 | 61 | M | P | A | 31 | M48 | Lenalidomide (D60) | - | - | - | - | - | - | + | 260 | <1.3 | 6.09 |
| 13 | 40 | M | S | A | NA | NA | NA | - | - | - | - | - | - | + | NA | NA | NA |
| 14 | 48 | F | P | A | 130 | M1 | - | - | - | - | - | - | - | + | 484 | 2.42 | 5.78 |
| 15 | 47 | M | P | A | 163 | M1 | R Etoposide (D15) | + | M1 | - | - | - | - | + | 500 | 5.7 | 7.57 |
| 16 | 28 | M | P | A | 23 | M15 | Etoposide (D15) | - | - | - | - | - | - | + | 60 | 6.73 | 6.5 |
| 17 | 41 | M | P | A | 93 | M15 | Lenalidomide (D90) | - | - | - | - | - | - | + | 23 | 2.09 | 3.93 |
| 18 | 53 | M | P | R | <5 | M23 | - | + | M15 | - | - | - | - | + | 189 | <1.3 | <2 |
| 19 | 57 | M | P | R | <5 | M23 | Interferon (D365) | + | M23 | - | - | - | - | + | 560 | 2.8 | <2 |
| 20 | 29 | M | P | A | 73 | M37 | Etoposide (D60) | + | M2 | - | - | - | - | + | 201 | <1.3 | 5.8 |
| 21 | 67 | M | P | R | <5 | M37 | - | + | M37 | - | - | - | - | + | 655 | <1.3 | <2 |
| 22 | 35 | M | P | A | 125 | M37 | - | - | - | - | - | - | - | + | 370 | 3.3 | 5.59 |
| 23 | 51 | M | P | A | 270 | M37 | Etoposide (D30) | - | - | - | - | - | - | + | 307 | 2.85 | 7.49 |
| 24 | 48 | M | P | A | 18 | M37 | - | - | - | - | - | - | - | + | 401 | 2.5 | 5.7 |
| 25 | 44 | F | P | A | 243 | M37 | - | - | - | - | - | - | - | + | 727 | <1.3 | 5.7 |
| 26 | 55 | M | P | A | 152 | M37 | - | - | - | - | - | - | - | + | 144 | 1.58 | 6.65 |
| 27 | 24 | F | S | A | 362 | M37 | NA | - | - | - | - | - | - | + | NA | NA | 6.48 |
| 28 | NA | M | S | A | NA | M37 | Prednisone (D15) | - | - | - | - | - | - | + | 36 | <1.3 | NA |
| 29 | NA | M | S | A | NA | M37 | NA | - | - | - | - | - | - | + | NA | NA | NA |
| 30 | 32 | M | S | A | NA | M37 | NA | - | - | - | - | - | - | + | 200 | NA | 3.24 |
| 31 | 42 | M | S | A | 150 | M37 | Bleomycine (D30) | - | - | - | - | - | - | + | 130 | NA | NA |
| 32 | 51 | M | P | A | 173 | M37 | Vinblastine (D15) | - | - | - | - | - | - | + | 95 | NA | 5.8 |
| 33 | 33 | F | P | A | 116 | M37 | - | - | - | - | - | - | - | + | 350 | <1.3 | 4.5 |
| | | | | | | | | | | | | | | | 556 | 2.6 | 7.5 |

F, female; **M**, male; **P**, peripheral blood mononuclear cells; **S**, splenic mononuclear cells; **A**, active; **R**, remission; **Anti-CD20**, rituximab; **NA**, not available; **NR**, not relevant.

Supplemental Table 2: KS patients' clinical data and laboratory characteristics.

| Patient | Age (years) | Gender | Sample | KS status | HIV | HAART at the time of sample collection | CD4/mm ³ | HIV RNA (log ₁₀ copies/mL) | HHV-8 DNA (log ₁₀ copies/10 ⁶ cells) |
|---------|-------------|--------|--------|-----------|-----|--|---------------------|---------------------------------------|--|
| 1 | 57 | M | P | A | - | NR | 404 | NR | NA |
| 2 | 57 | M | P | CR | - | NR | 719 | NR | <2 |
| 3 | 64 | M | P | CR | - | NR | 1144 | NR | <2 |
| 4 | 36 | M | P | A | + | NA | 154 | NA | 2.59 |
| 5 | 73 | M | P | A | - | NR | 361 | NR | <2 |
| 6 | 35 | M | P | PR | + | + | 397 | <1.6 | <2 |
| 7 | 35 | M | P | PR | + | + | 397 | <1.6 | <2 |
| 8 | 43 | M | P | A | + | + | 49 | 5.88 | <2 |
| 9 | 39 | M | P | A | + | - | 127 | 4.38 | <2 |
| 10 | 51 | M | P | A | - | NR | 435 | NR | <2 |
| 11 | 70 | M | P | A | - | NR | 863 | NR | <2 |
| 12 | 73 | M | P | A | - | NR | 420 | NR | 2.32 |
| 13 | 62 | M | P | A | - | NR | 517 | NR | <2 |
| 14 | 82 | M | P | CR | + | + | 173 | NR | NA |
| 15 | 47 | F | P | CR | + | + | 398 | <1.6 | <2 |
| 16 | 83 | M | P | NA | - | NR | NA | NR | <2 |
| 17 | 51 | M | P | A | + | + | 514 | 1.3 | <2 |
| 18 | 42 | F | P | NA | + | + | 845 | <1.6 | <2 |
| 19 | 36 | M | P | A | + | - | 113 | 2.79 | 2.34 |
| 20 | 51 | M | P | A | + | + | 337 | 18.6 | <2 |
| 21 | 33 | M | P | A | + | + | 501 | NA | NA |
| 22 | 40 | M | P | A | + | - | 45 | 4.47 | NA |
| 23 | 41 | M | P | A | - | NR | 636 | NR | <2 |
| 24 | 62 | F | P | A | - | NR | 1036 | NR | <2 |

F, female; **M**, male; **P**, peripheral blood mononuclear cells; **A**, active; **CR**, complete remission; **PR**, partial remission; **NA**, not available; **NR**, not relevant.

Supplemental Figures

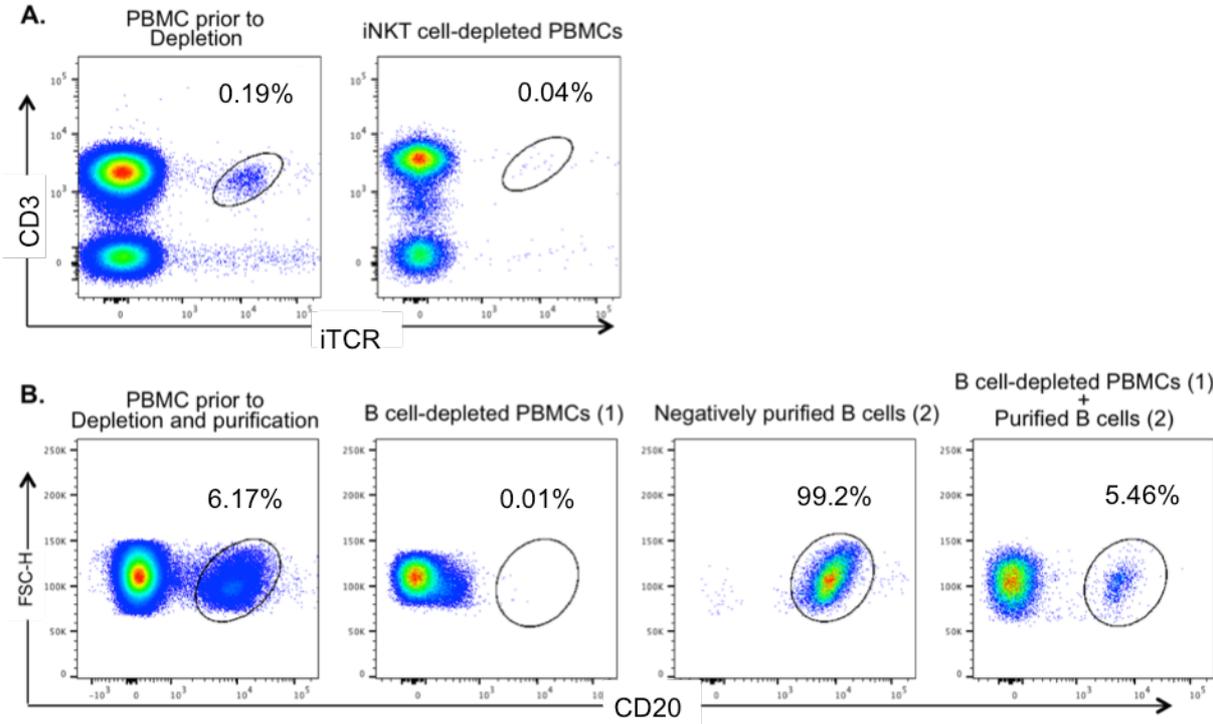


Figure S1. iNKT and B cell purities pre- and post-magnetic purification.

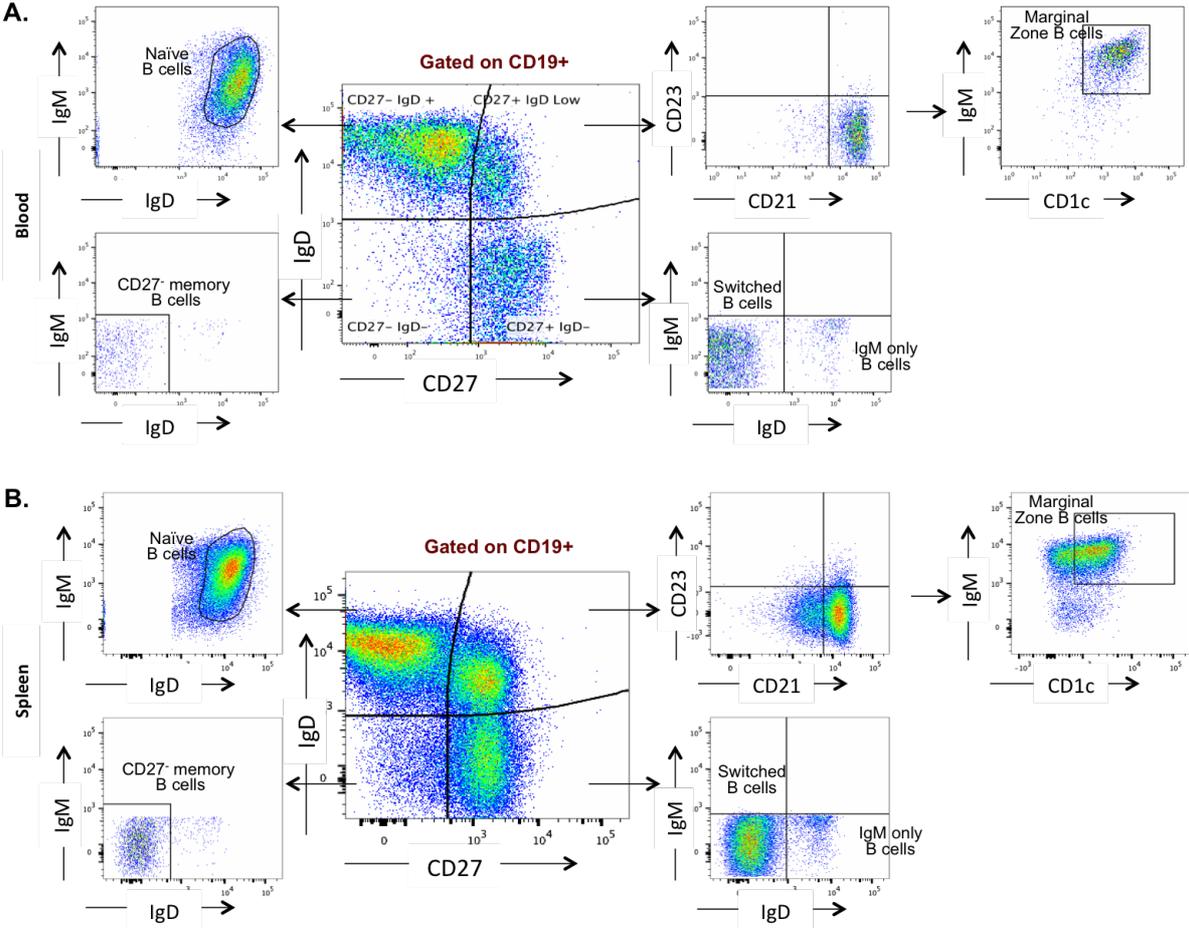


Figure S2. Gating strategy of B cell subsets analysis.

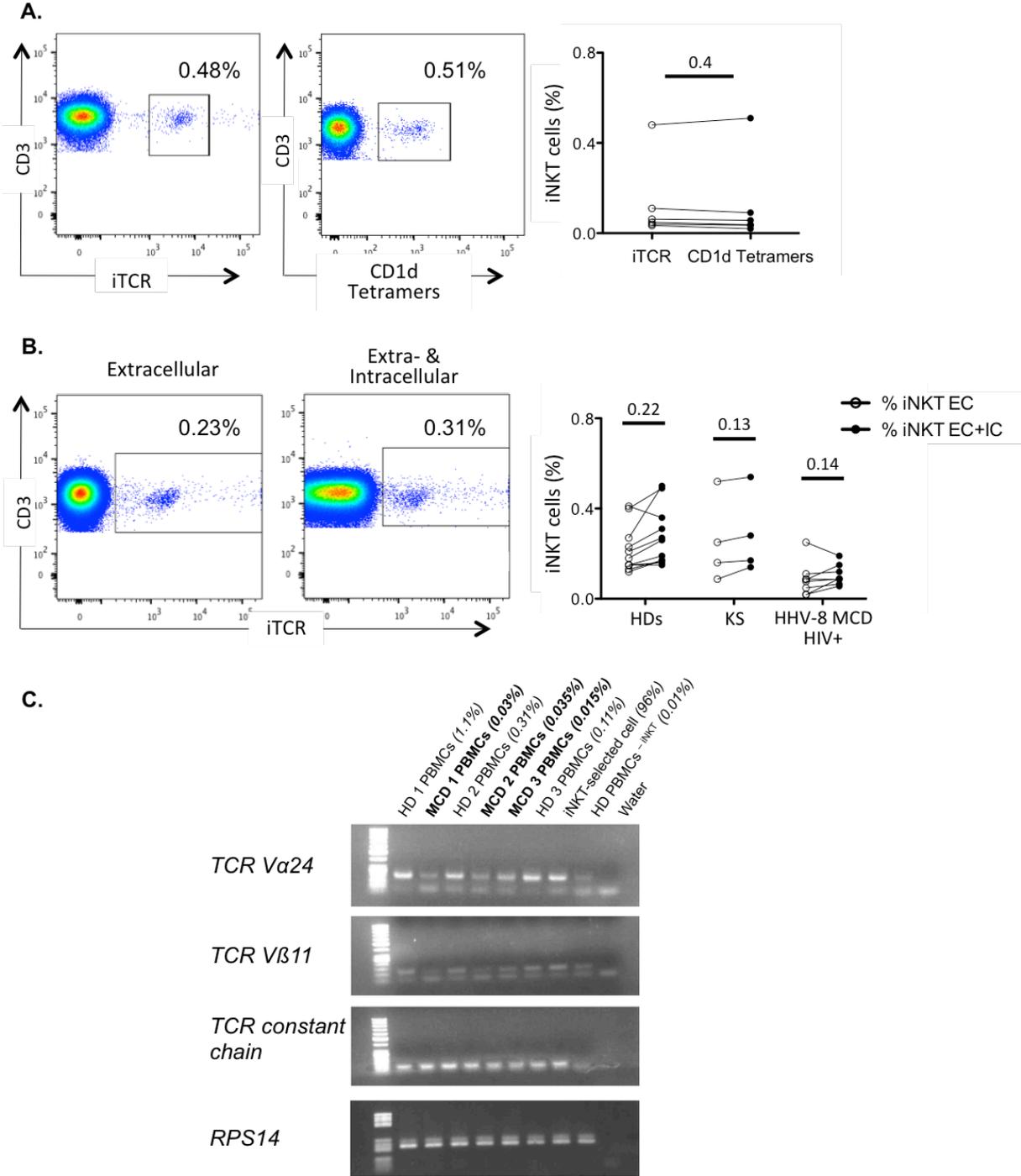


Figure S3. Detection of iNKT cells in peripheral blood.

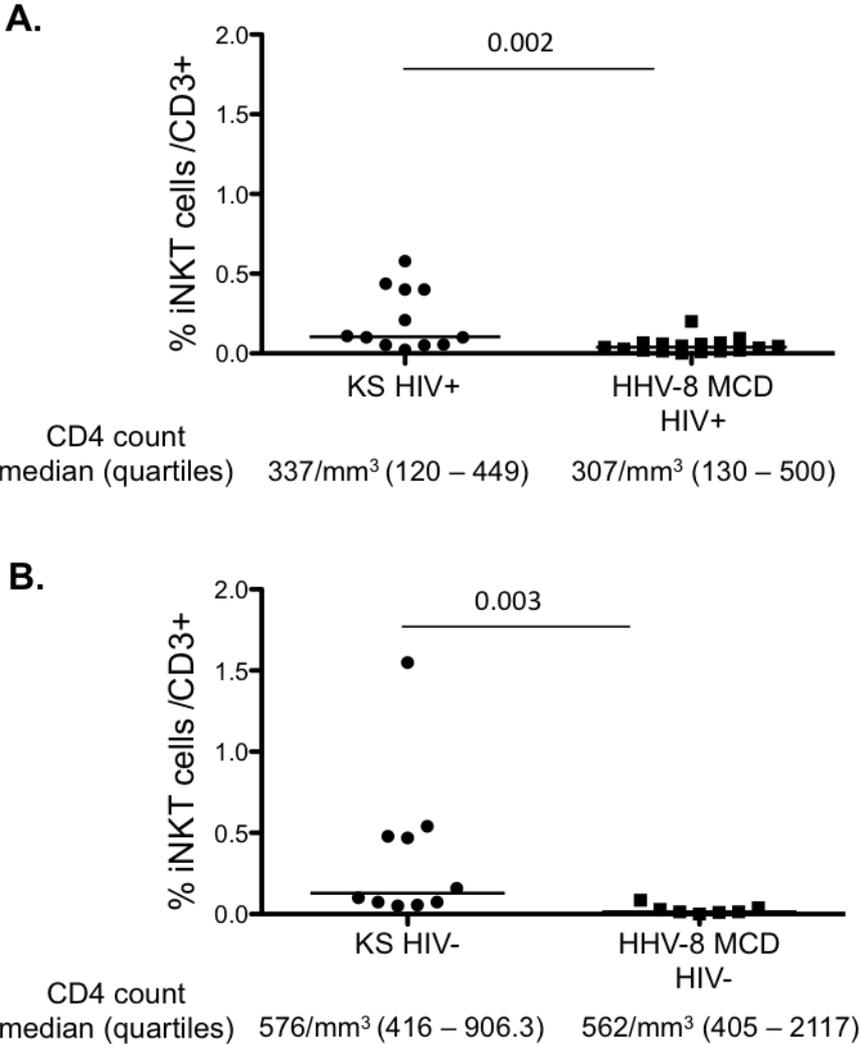


Figure S4. The decreased frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD are not associated with modifications of iNKT cells related to HIV infection or to age.

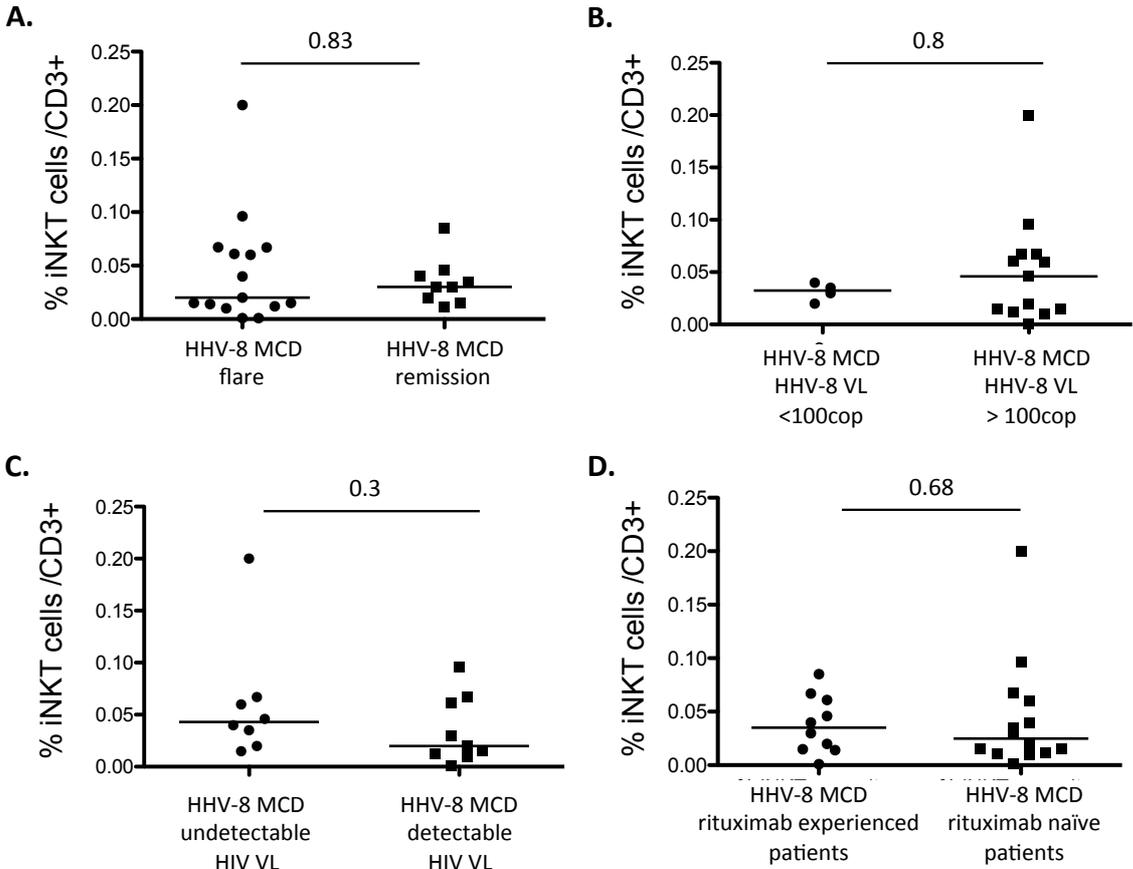


Figure S5. The decreased frequencies of iNKT cells in patients with HHV-8 MCD are not associated with modifications of iNKT cells related to cell death during HHV-8 MCD flare, HHV-8 or HIV replication or to rituximab administration.

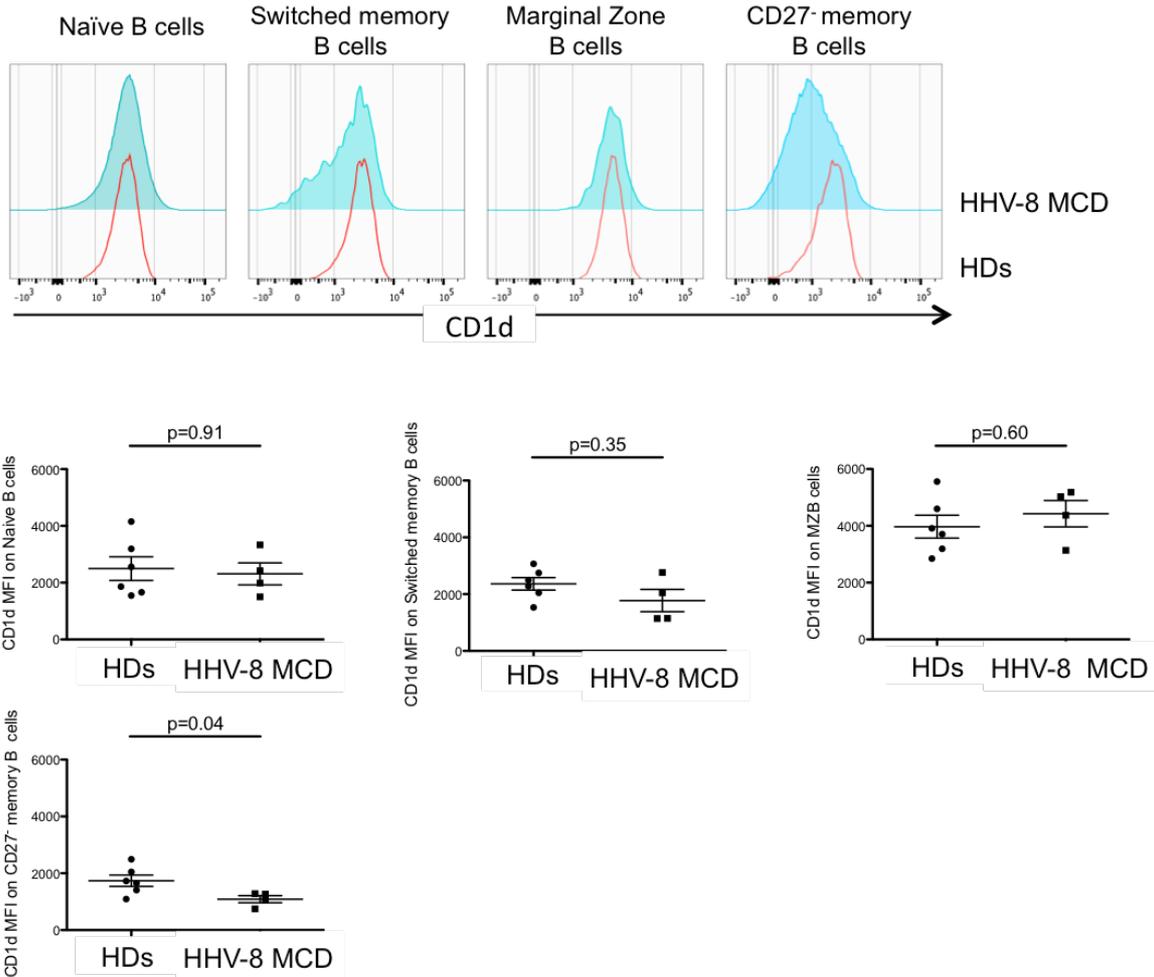


Figure S6. The iNKT cell defects are not associated with an alteration of the expression of CD1d on the surface B cell subsets in the SMCs of patients with HHV-8 MCD.

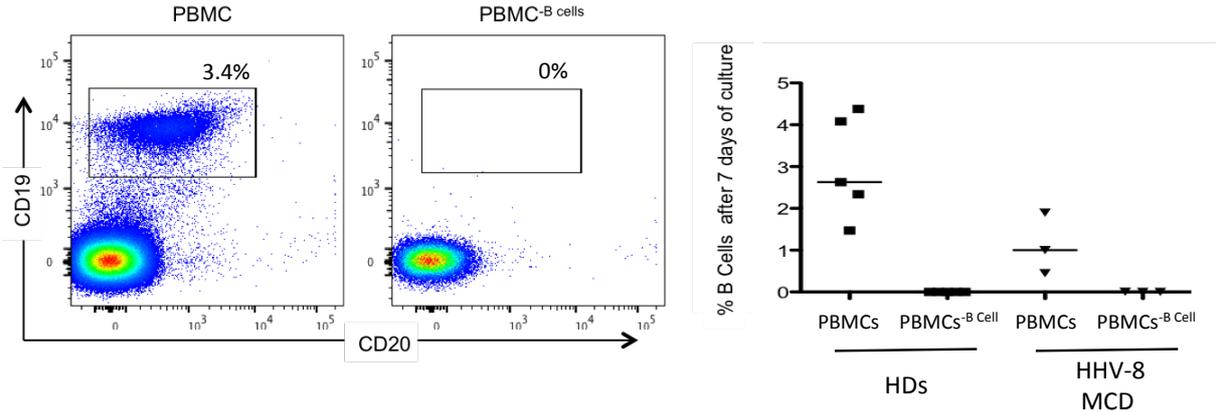


Figure S7. Absence of B cells after 7 days of culture in B cells depleted PBMCs.

II. Analyse du profil d'expression des gènes des lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 circulants détectés chez les patients MCM HHV-8+

Zineb Sbihi,¹ Antoine Dossier,² David Boutboul,³ Lionel Galicier,³ Bénédicte Hoareau,⁵ Claire Fieschi,³ Delphine Sterlin,¹ Karim Dorgham,¹ Véronique Morin,¹ Rima Zoorob,¹ Brigitte Autran,⁴ Eric Oksenhendler,³ and Guislaine Carcelain⁴

La Maladie de Castleman Multicentrique associée à l'infection par HHV-8 (MCM) est caractérisée histologiquement par une prolifération de lymphocytes B infectés par HHV-8 (détecté par la présence de la protéine majeure de latence du virus : LANA) en différenciation plasmocytaire porteur d'un IgM restreinte à la chaîne λ . Ces lymphocytes B monotypiques présents dans les lésions de MCM seraient polyclonaux et sans mutation somatiques d'après une seule étude de la littérature (Du et al., 2001).

Un marquage en cytométrie en flux des cellules B plasmablastiques infectées par HHV-8 a été mis au point en utilisant la protéine nucléaire de latence LANA de HHV-8 utilisée pour le diagnostic en immunohistochimie et exprimée dans 100% des cellules infectées. L'analyse par cytométrie de l'expression de la protéine virale LANA nous a permis de détecter des cellules LANA⁺ dans le sang circulant des patients MCM HHV-8+. Ces cellules sont des lymphocytes B n'exprimant que l'IgM, exprimant toutes la chaîne légère λ et dont le phénotype correspond bien à celui des plasmablastes CD20, CD19, IgD, CD27, CD38, Ki67+ retrouvés en immunohistochimie au niveau des lésions ganglionnaires des patients MCM HHV-8+ (Du et al., 2001). La caractérisation phénotypique de ces lymphocytes B LANA⁺ montre une diminution significative de l'expression de CD40 ce qui est cohérent avec leur localisation en dehors du centre germinatif en histologie. Ainsi, pour la première fois nous montrons que ces cellules sont détectables dans le sang et dans la rate des patients et nous accédons à du matériel pour les analyser extensivement au niveau transcriptomique. Pour ce faire, les lymphocytes B LANA⁺ de patients MCM HHV-8+ et les lymphocytes B naïfs, mémoires switchés et de la zone marginale ont été triés à partir de PBMCs de donneurs sains et de patients MCM HHV-8+.

La protéine LANA est la protéine majeure de latence du virus HHV-8. C'est un analogue de la protéine EBNA1 du virus EBV qui est nécessaire à la persistance du génome viral et toujours exprimée dans toutes les cellules infectées quel que soit le stade latence ou lyse. Elle est utilisée pour le diagnostic de la maladie en immunohistochimie et a de fait été choisie par l'équipe pour identifier les lymphocytes B infectés par HHV-8 en Cytométrie en Flux. La protéine LANA étant présente dans le noyau, sa détection en CMF nécessite la perméabilisation et la fixation des cellules ce qui ne permet pas de l'utiliser pour le tri en vue d'études moléculaires secondaires. De fait, pour trier les lymphocytes B infectés par HHV-8 nous avons utilisé une stratégie de tri sans utilisation de LANA débutant par l'utilisation du marqueur CD40 car tous les lymphocytes B expriment CD40 contrairement aux lymphocytes B LANA+. Puis nous avons sélectionné uniquement des lymphocytes B en choisissant les cellules exprimant lambda et CD38. La spécificité de ce tri de cellules HHV8+ a secondairement été vérifié en cytométrie et PCR quant à l'expression de LANA.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons analysé le profil d'expression génique des cellules B infectées par HHV-8 par rapport à celui de sous populations B normales à l'aide d'une puce d'expression génique (Illumina HT-12 V4 expression BeadChip). Nos résultats montrent clairement que les cellules infectées par HHV-8 présentent un profil d'expression génique très différent de celui des sous populations B normales. Leur profil est par ailleurs caractéristique de plasmablastes. De plus, ces cellules sont en prolifération, modulent négativement l'expression de beaucoup de gènes associés à l'immunité et l'adhésion cellulaire.

Au total, ces résultats nous permettent de proposer un modèle de la physiopathologie de la MCM associée à l'infection HHV-8.

Manuscript

Gene expression profiling of circulating HHV-8-infected B cells in patients with Multicentric Castleman Disease

Zineb Sbihi,¹ Antoine Dossier,² David Boutboul,³ Karim Dorgham,¹ Delphine Sterlin,¹ Bénédicte Hoareau,⁵ Lionel Galicier,³ Claire Fieschi,³ Brigitte Autran,⁴ Véronique Morin,¹ Rima Zoorob,¹ Eric Oksenhendler,³ and Guislaine Carcelain⁴

¹Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, ERL Centre national de la recherche scientifique (CNRS) 8255, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, France ; ²Hôpital Bichat, Médecine Interne, F-75018 Paris, France ; ³Hôpital Saint-Louis, Immunologie clinique, F-75010 Paris, France ; ⁴Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Cimi-Paris), UMR 1135, ERL CNRS 8255, 91 Boulevard de l'Hôpital, F-75013 Paris, Département d'Immunologie, CHU Pitié-Salpêtrière, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, 47-83 bd de l'hôpital, F-75013 Paris, France ; ⁵Sorbonne Universités, Université Pierre et Marie Curie (UPMC) Univ Paris 06, UMS30-LUMIC, Platerforme CyPS, Paris, France.

Correspondance : Pr Guislaine CARCELAIN, Laboratoire d'Immunologie, Hôpital Robert-Debré, 48 boulevard Sérurier, 75019 Paris, France. E-mail: guislaine.carcelain@aphp.fr. Tel: +33 (1) 42 17 79 30, Fax: +33 (1) 42 17 74 90.

Abstract

Human Herpesvirus-8 is specifically associated with monotypic (IgM/ λ) plasmablasts in Multicentric Castleman disease (HHV-8 MCD), which is a B lymphoproliferative disorder. The plasmablasts occur as isolated cells in the mantle zone of B cell follicles of lymph nodes and the spleen but may form microlymphoma or frank plasmablastic lymphoma. These cells express transcription factors suggesting they are at the plasmablast or pre-plasma cell stage of differentiation. We demonstrated that HHV-8 MCD is associated with circulating plasmablasts detected during the flare of the disease, with the typical phenotype of the MCD HHV-8-infected plasmablasts in MCD lesions. Using gene expression profile analysis (about 48 000 genes), we showed that MCD HHV-8-infected cells displayed a common gene expression profile that is clearly distinct from all the normal B cell subpopulations. These cells showed features of plasmablasts and plasma cells and have a transcriptomic pattern that demonstrates that these cells are proliferating and escaping the immune system. Our results identify a set of genes specifically expressed in MCD HHV-8-infected cells, suggesting their potential pathogenetic and clinical significance.

Introduction

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV), also known as human herpes virus 8 (HHV-8), belongs to the gamma-herpesvirus subfamily and shows homology to Epstein-Barr virus (EBV). HHV-8 was discovered in AIDS-associated Kaposi's sarcoma (Chang et al., 1994) and has since fulfilled criteria for causing all forms of this disease (Boshoff and Weiss, 2001; Dossier et al., 2013; Soulier et al., 1995). HHV-8 is also present in two B cell lymphomas, primary effusion lymphoma (PEL) (Cesarman et al., 1995), and plasmablastic lymphoma associated with Multicentric Castleman Disease (HHV-8 MCD) (Ganem, 2010).

HHV-8 MCD is a lymphoproliferative disorder, localized in the mantle zone of lymph nodes and the spleen, and comprising HHV-8-infected-plasmablasts expressing IgM exclusively with the λ light chain (Du et al., 2001; Dupin et al., 2000). These cells have the cytologic features of classical immunoblasts, with a normal to large size and are termed "Plasmablasts". All these cells stain positive for the viral protein LANA (latency associated nuclear antigen) indicating that they are all infected by HHV-8 but are never co-infected with EBV (Oksenhendler et al. 2008). They were initially reported to be CD20 positive, but later studies failed to reproduce the same results. They are, CD27 "variable", CD30 negative, and Ki67 positive in all these cells, Blimp 1 and IRF4 positive, Pax 5 and BCL-6 negative, suggesting that the cells are at the plasmablast or pre-plasma cell stage of differentiation (Chadburn et al., 2008). In MCD, these HHV-8-infected plasmablasts typically occur as isolated cells but may coalesce to form microscopic aggregates that have been referred to as microlymphomas (Dupin et al., 2000). Moreover, in some cases HHV-8-positive plasmablasts may form plasmablastic lymphoma (Dupin et al., 2000).

The finding that HHV-8 positive plasmablasts in MCD are monotypic is intriguing and raises the question whether this is indicative of monoclonality or the result of targeting of λ -expressing B cells by the virus. However, in a single study, analysis of the BCR (B Cell Receptor) repertoire of LANA-positive plasmablasts, obtained through micro dissection, has led to the conclusion that although monotypic, these cells were polyclonal (Du et al., 2001). Moreover, in the same study, the authors have shown that these cells, while being differentiated towards a plasmablastic phenotype, were naïve B cells, as illustrated by the lack of somatic hypermutations (Dupin et al. 2000).

Despite the knowledge gained on MCD, the phenotype of MCD HHV-8-infected cells is understood only in part, and the knowledge on the cellular derivation of this tumor is still based on the expression of a few phenotypic markers in immunohistochemistry analysis

performed on lymphoid tissues. The setting of LANA⁺ HHV-8 infected cells detection by flow cytometry analysis allowed us to demonstrate that during MCD flares few HHV-8-infected plasmablasts resembling to the HHV-8 infected cells of MCD lesions can be detected in blood without B cell lymphocytosis. We took advantage of such peripheral detection of HHV-8-plasmablasts to purify these cells and perform their extensive analysis comparatively to their splenic counterpart and to normal B cell subsets by cytometry and gene expression profiling using human Illumina HT-12 V4 microarrays representative of about 48,000 genes to identify genes that are specifically expressed in these infected cells.

Methods

Patients and controls

This study included 2 groups of subjects. The first group comprised patients with HHV-8 MCD (Table 1 and Table S1). Samples of their blood, spleen, or both were collected at Saint-Louis Hospital (E.O.) from 32 patients (24 HIV+ and 8 HIV-). Splenectomy was performed during active MCD; the recorded reasons were symptomatic splenomegaly, suspicion of lymphoma, or both. Blood samples were collected from 26 patients (18 HIV+ and 8 HIV-), spleen samples from 9 patients (8 HIV+ and 1 HIV-), and samples from both sources were available for 3 patients. The second group of controls comprised 10 healthy donors (HDs) from the Etablissement Français du sang, 3 HIV patients with Kaposi Sarcoma and 3 asymptomatic HHV-8 carriers. Table 1 and Table S1 summarizes patients' clinical and laboratory characteristics. Flare was defined as the presence of constitutional symptoms, progressive lymph node or spleen enlargement, and elevated levels of serum markers of inflammation. Remission was defined as the absence of these findings.

Cell isolation

Blocks of spleen were mechanically dissociated and digested using type VII collagenase and DNase (Sigma-Aldrich) in RPMI 1640 supplemented with 2% fetal calf serum (Biowest). Cell aggregates were further dissociated using 10 mM EDTA (Sigma-Aldrich) with agitation. Spleen mononuclear cells (SMCs) were isolated from splenocyte suspensions, and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood through FicollHypaque (Eurobio).

HHV-8-infected cell line, BC-3

Frozen samples of BC-3 cell line were kindly provided by Dr A.G Marcelin (Hôpital Pitié Salpêtrière, Virology Department). BC-3 cell line was established from a lymphomatous effusion obtained from an HIV- patient. The lymphomatous cells are stably infected by KSHV (approximately 36 copies of KSHV DNA per cell), but not by EBV. LANA KSHV antigen is constantly expressed in BC3 cell line (Arvanitakis et al., 1996).

Flow cytometry analyses and cell sorting

Antibody labelling. Rat monoclonal antibody (mAb) against LANA (clone LN 53, IgG2c, Advanced Biotechnologies) was conjugated with the Alexa Fluor 647 fluorochrome using

Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Life Technologies). Isotype control (BD Biosciences, San Jose, CA) was conjugated following the same protocol.

Cell staining. Dyes used were: Viability Dye efluor786 (eBioscience), and Live/Dead Blue UV (Invitrogen). Antibodies used were: anti-CD19, CD20, CD27, CD19, CD27, CD38, CD40, CD138, immunoglobulin D (IgD), IgM, Ki67 (BD Biosciences, San Jose, CA), anti- κ and - λ (Dako), LANA-AF647. Intracellular staining (LANA detection and Ki67 expression) were performed after cells fixation and permeabilisation using FoxP3 staining kit from eBiosciences (LANA staining, Figure S1).

Cell Sorting. Live HHV-8-infected cells and B cell subpopulations were sorted with a FACSAria flow cytometer (BD Biosciences) in an L2 facility as HHV-8-infected cells, Naïve, switched memory and marginal zone B cells, with purity more than 95%, using the following monoclonal antibodies: anti-CD19, -CD20, -CD40, -IgM, -IgD, -CD27, -CD38 (BD Biosciences, San Jose, CA), anti- κ , and anti- λ (Dako).

We analyzed $> 5 \times 10^5$ cells. The limit of detection of LANA+ HHV-8-infected cells was defined as <50 cells. Cell sorting of $CD40^- \lambda^+ IgM^+ CD38^+$ B cells was validated using post-sort analyses to verify the purity of the sorted cell population. Data were acquired using a FACSCanto II or LSRFortessa, sorted using Aria (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo X (TreeStar).

RNA extraction and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from total PBMCs and each sorted B-cell subpopulation of HDs and Patients with HHV-8 MCD using RNAqueous kit (Invitrogen, Thermofisher) according to the manufacturer's instructions, treated with DNase (Invitrogen, Thermofisher), checked for purity on a ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop-Technologies) and cDNA synthesis was performed using High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied-Biosystems, Life Technologies) or Super script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Thermofisher), before being used in microarray or RT-PCR experiments respectively.

Reverse transcriptase (RT)-PCR analysis of LANA mRNA expression

RT-PCR was used to detect LANA (ORF73 gene) mRNA expression. Two microliters of diluted cDNA samples were added to 23 μ l reaction mixture containing 0.5 unit of AmpliTaq Gold (Applied Biosystems, Thermofisher) for PCR. The reaction conditions were optimized for each pair of primers. The following gene-specific primers were used: β -actin sense (5-GGCATCCTCACCTGAAGTA-3) and antisense (5-CCTGAAGCTCGTTCTCTACC-3)

used as an endogenous control; and LANA sense (5- CCGGTGGCTCCCATTTCCTTCA -3) and antisense (5-CTCAGAAGAGTTTCCGGTGGC-3) (Eurogentech). Amplified products were separated by agarose gel electrophoresis.

Microarray experiments

cDNA samples were amplified with SPIA (Ovation-PicoSL WTA-System-V2; NuGEN-Technologies), and biotin-labeled (EncoreBiotinIL-Module; NuGEN-Technologies, San Carlos, California, USA). Integrity of the cDNA samples purified on filtration columns (MinElute PCR Purification Kit; Qiagen, Hilden, Germany) was checked on a 2100-BioAnalyzer (Agilent-Technologies, Santa Clara, California, USA). Biotinylated cDNA (750 ng) from each sample was hybridized on Illumina HT-12 V4 Expression-BeadChips. Arrays were scanned on the iScan System.

Gene Set Enrichment Analysis and Gene Ontologies (GO)

For the identification of enriched gene signatures, we used the gene set enrichment analysis (GSEA) tool available from the Broad Institute website. GSEA was performed by comparison of normalized gene-expression data obtained from LANA⁺ HHV-8-infected B cells and B cells subpopulations. We performed GSEA on pre-ranked 2 lists of genes of the differentially expressed genes in LANA⁺ HHV-8-infected B cells and B cells subpopulations (FDR < 0.01 and FDR < 0.01). To generate these pre-ranked lists, we analyzed the gene expression profile of LANA⁺ HHV-8-infected B cells in comparison with B cells subpopulations. The query gene sets included gene signatures related to BLIMP-1 repressed genes, B cell identity, XBP-1 target genes and plasma cell differentiation programs. The well-defined gene signatures related to the different steps of the mature B-cell and plasma cell differentiation programs, and signatures of genes modulated by BLIMP1 and XBP1 were obtained from different publications (Table 3). We screened the collection of signatures under the categories H (hallmark gene sets, E2F targets, G2M checkpoint, unfolded protein response, oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism, glycolysis, etc.) signatures were downloaded from the MSigDB, Molecular Signature Database of Broad Institute.

GSEA was performed using GSEA software, Version 2.0.1, which was obtained from the Broad Institute (<http://www.broad.mit.edu/gsea>). Enrichment map was used for visualization of the GSEA results. False discovery rate (FDR) value and normalized enrichment score (NES) were used to sort the pathways enriched in each phenotype after gene set permutations were performed 1000 times for each analysis.

KSHV DNA quantification

For each sample analyzed, we also prepared dried pellets of 1.10^6 cells to quantify KSHV DNA. KSHV DNA quantification was performed in collaboration with the Virology Department of Saint Louis Hospital thank to the kind assistance of Dr Felix Agbalika. Briefly, DNA was extracted from frozen cells using a QIAamp blood extraction kit (Qiagen, Courtabeuf, France) and was amplified by rt-PCR (ABI PRISM 7700; Perkin Elmer Applied Biosystems, Foster City, California). Dilutions of known amounts ($10\text{-}10^7$ copies) of a fragment of viral DNA (KS 330-233 primer sequences) cloned in a plasmid were used to establish the standard curve, and allowed to estimate the quantity of viral DNA extracted from the cells analyzed.

Statistical Analysis

The Wilcoxon test was used to compare paired variables (mean fluorescence intensity (MFI) of CD40, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, Ki67 and CD138). The Pearson correlation test was used to evaluate the correlation between individual indicators (percentage of LANA⁺ HHV-8-infected cells and cellular KSHV DNA quantification). All statistical analyses were performed using Prism 5 software (Graph Pad Software). P values < 0.05 indicate statistical significance.

To cluster the samples according to the similarity of their gene expression patterns, we performed unsupervised principal component analysis (PCA) using Partek Genomics Suite. Data were first normalized and \log_2 transformed. To select genes that are most informative, the analysis was limited to a subset of 1596 genes with the highest standard deviation across the 64 samples. The hierarchical clustering algorithm used to generate the dendrogram is based on the average-linkage method. The distance between two individual samples is calculated by Pearson distance with the normalized expression values. Genes differentially expressed between the different groups were identified by using ANOVA. Fold ratio induction or repression of individual genes was calculated by comparing mean gene expression levels of the different groups. Probes were considered differentially expressed if they met the following two criteria: (i) a p-value 0.001 (ANOVA), which corresponds to a Benjamini-Hochberg False discovery rate (FDR) of 0.1%; and (ii) an absolute fold ratio ≥ 2 . Hierarchical clustering of the differentially expressed genes was performed using Partek Genomics Suite software using Euclidean distance.

Study approval

Blood samples were obtained after acquiring the patient's informed consent, in accordance with Institutional Guidelines and the Declaration of Helsinki. The study complied with the human experimentation guidelines of Pitié-Salpêtrière Hospital.

Table 1: HHV-8 MCD patients' clinical data and laboratory characteristics.

| Patients | Sample | Age (years) | Gender | HIV | MCD status | KS | HHV-8 load, log ₁₀ /10 ⁶ cells | HHV-8 LANA+ cells % | % of LANA+ cells | | | |
|----------|--------|-------------|--------|-----|-----------------------|----|--|---------------------|------------------|-----------------|---------------|---------------|
| | | | | | | | | | IgM heavy-chain | IgD heavy-chain | λ light-chain | κ light-chain |
| MCD1 | P | 87,00 | M | - | A | + | 5.8 | 0.24 | 36.2 | 2.0 | 35.5 | 1.7 |
| MCD2 | P | 44,68 | M | + | A | - | 7.04 | 0.76 | 46.6 | 6.8 | 93.4 | 2.1 |
| MCD3 | S | 94,89 | M | + | A | + | 5.8 | 0.077 | 78.5 | 3.0 | 91.3 | 1.3 |
| MCD4 | P | 69,00 | M | - | A | - | 5.58 | 0.015 | NA | NA | NA | NA |
| MCD5 | S | 42,54 | M | + | A | + | 5.7 | 1.57 | 90.4 | 1.1 | 93.1 | 0.21 |
| MCD6 | S | NA | M | + | A | - | 6.48 | 0.44 | 82.5 | 7.0 | 83.1 | 0.8 |
| MCD7 | S | 24,00 | F | + | A | NA | NA | 2.49 | 89.2 | 1.4 | 88.5 | NA |
| MCD8 | P | 32,43 | F | + | A | + | 7.5 | 2.77 | 97.4 | 2.2 | 93.9 | 0.14 |
| MCD9 | P | 51,04 | M | + | A | - | 7.49 | 0.63 | 88.0 | 14.3 | 92.8 | 1.03 |
| MCD10 | P | 61,30 | M | + | A | + | 6.06 | 0.37 | 79.1 | NA | 72.8 | 0.5 |
| MCD11 | P | 60,51 | M | + | A / Primary infection | + | 5 | 17.0 | 95.9 | NA | 96.2 | 0.02 |
| MCD12 | P | 29,40 | M | + | A | + | NA | 0.41 | 94 | NA | 91.5 | 0.07 |
| MCD13 | P | 47,35 | M | + | A | NA | NA | 6.0 | NA | NA | NA | NA |
| MCD14 | P | 50,79 | M | + | A | - | 4.5 | 0.33 | 75.5 | 9.4 | 58.0 | 0.0 |
| MCD15 | P | 46,79 | M | + | A | - | 7.57 | 0.36 | 92.8 | 1.5 | 90.9 | 0.5 |
| MCD16 | P | 35,31 | M | + | A | - | 5.59 | 0.02 | 96.0 | 6.4 | 23.7 | 0.4 |
| MCD17 | P | 65,35 | M | NA | A | NA | NA | 3.83 | 82.9 | 0.7 | 95.7 | 0.21 |

F, female; *M*, male; *P*, peripheral blood mononuclear cells; *S*, splenic mononuclear cells; *A*, active; *R*, remission; *NA*, not available.

Results

Identification and phenotypic characterization of HHV-8-infected B cells in peripheral blood and spleen from patients with MCD

We analyzed the LANA viral antigen expression in PBMCs or SMCs by flow cytometry from 32 patients with HHV-8 MCD (Table 1). Among this cohort, we identified LANA⁺ HHV-8-infected B cells in 13 blood and 4 spleen samples from 17 patients. All LANA⁺ HHV-8-infected B cells were monotypic, expressing an IgM heavy-chain and a λ light-chain of the B cell receptor (BCR) (Figure 1A). The detection of LANA expressing cells was always associated with the flare of the disease (Table 1). In addition, there was a significant positive correlation between the frequency of LANA⁺ HHV-8-infected B cells and the quantification of cellular KSHV DNA ($R = 0.76$; $P < 0.0001$) (Figure 1B).

Moreover, LANA⁺ HHV-8-infected B cells were specifically detected in blood and spleen samples from patients with HHV-8 MCD, but not in blood samples from HIV seropositive untreated patients with active HHV-8 KS without MCD, from asymptomatic carriers seropositive for HHV-8, or from HHV-8 seronegative healthy donors (Figure S2).

To further characterize the phenotype of LANA⁺ HHV-8-infected B cells, we analyzed the expression of CD40, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, Ki67 and CD138 on LANA⁺ HHV-8-infected B cells, switched memory, as well as naïve B cells from patients with HHV-8 MCD (Figure 1C). The MFI values show that LANA⁺ HHV-8-infected B cells, as compared to switched memory and naïve B cells, are CD19⁻ CD20⁻ IgD⁻ CD38^{high} Ki67^{high} CD138⁻ with a variable expression of CD27. Finally, expression levels of CD40 were significantly lower on LANA⁺ HHV-8-infected B cells, as compared to those on switched memory and naïve B cells ($P = 0.004$). Hence, LANA⁺ HHV-8-infected B cells are IgM⁺ λ ⁺ CD20⁻ CD19⁻ CD27^{+/-} IgD⁻ CD38^{high} Ki67^{high} CD138⁻ and do not express CD40.

To further characterize the phenotype of these cells, we also analyzed the expression of six molecules of the SLAM Family of immunoreceptors, including SLAM, CRACC, NTB-A, CD48, CD84 and CD229 in blood and spleen samples from a small number of patients with HHV-8 MCD. For all the SLAM molecules analyzed, the measured MFI values differed significantly between LANA⁺ HHV-8-infected B cells and CD19⁺ B cells. As compared to the latter cells, the overall “SLAM phenotype” of LANA⁺ IgM⁺ cells was as follow SLAM^{low}, CD84^{low}, and NTB-A^{low}, CD229^{high}, CD48^{high} and CRACC^{high} (data not shown).

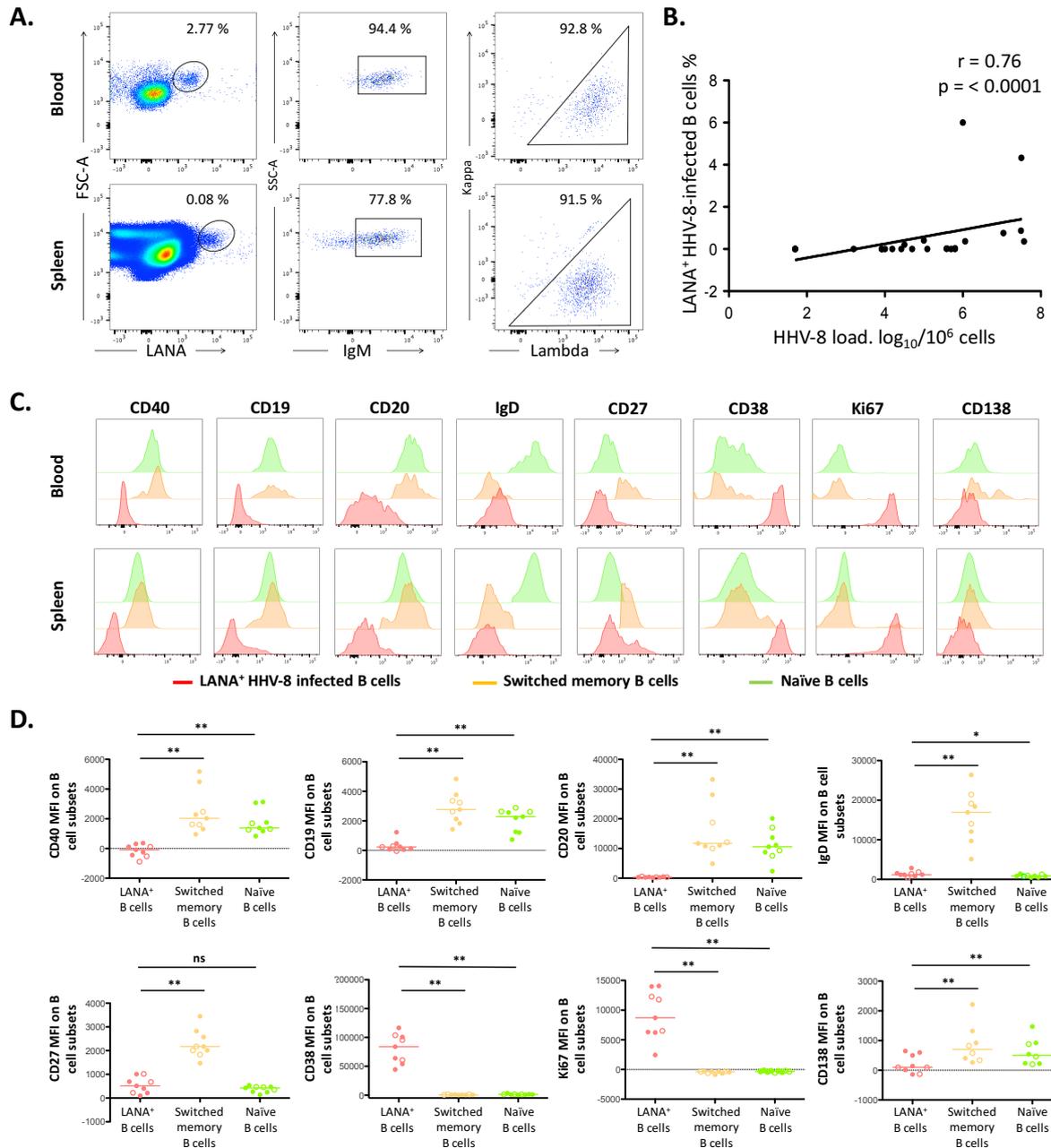


Figure 1. Identification and phenotypic characterization of HHV-8-infected B cells. PBMCs and SMCs from patients with HHV-8 MCD were stained for nuclear expression of the viral protein LANA and surface expression of IgM, κ and λ to identify HHV-8-infected B cells, and were analyzed by flow cytometry for the expression of CD40, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, Ki67 and CD138. (A) Representative flow cytometry plot of PBMCs and SMCs samples from two different patients with HHV-8 MCD. LANA⁺ HHV-8-infected B cells are analyzed for their IgM, κ and λ expression. Cell surface expression of IgM and κ or λ gated on LANA⁺ HHV-8-infected B cells is showed. The dotplots with the percentage of positive cells is indicated in each graph. (B) Correlation plot show the relationship between the frequency of LANA⁺ HHV-8-infected B cells with HHV-8 viral load in the PBMCs of patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Spearman's correlation test. (C) Representative histograms showing surface expression of CD40, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, Ki67 and CD138 on LANA⁺ HHV-8-infected B cells, switched memory and naïve B cells in the PBMCs (plain circle, $n = 6$) and the SMCs (empty circle, $n = 3$) from patients with HHV-8 MCD. Scatter plots showing MFI and median of CD40, CD19, CD20, IgD, CD27, CD38, Ki67 and CD138

on LANA⁺ HHV-8-infected B cells, switched memory and naïve B cells in the PBMCs and the SMCs of patients with HHV-8 MCD. Significant $P < 0.05$, Wilcoxon paired test.

Sorting of HHV-8-infected B cells from PBMCs

We next proceeded to flow cytometry sorting with the aim to isolate and characterize the LANA⁺ HHV-8-infected cells in detail at the molecular level. However, because of the nuclear expression of LANA, we could not sort HHV-8-infected B cells based on the expression of this viral protein. We therefore took advantage of the phenotypic characterization of these cells, described above and the observation that LANA⁺ HHV-8-infected B cells do not express CD40, have a restricted expression of C μ heavy and λ light chains and furthermore express high level of CD38 at their cell surface. Using the gating strategy depicted in Figure 2A, we could clearly define the HHV-8-infected B cells, together with other distinct B cell subpopulations: naïve (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD⁺), switched memory (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgM⁻ IgD⁻) and marginal zone (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD^{low}) B cells from PBMCs. Next, CD40⁻ λ ⁺ IgM⁺ CD38⁺ B cells were sorted from PBMC from 6 out of 10 HHV-8 MCD patients, whereas naïve, switched memory and marginal zone B cells were sorted from PBMCs from 10 HHV-8 MCD patients and from 9 healthy donors (Figure 2B and supplementary Table S2).

The sorted CD40⁻ λ ⁺ IgM⁺ CD38⁺ B cells were analyzed for LANA expression in comparison with sorted naïve B cells from the same patients. All CD40⁻ λ ⁺ IgM⁺ CD38⁺ sorted cells with a purity greater than 83%, expressed LANA (Figure 2C). These results were confirmed by reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis showing the expression of LANA transcripts in the sorted cells (Figure S2D).

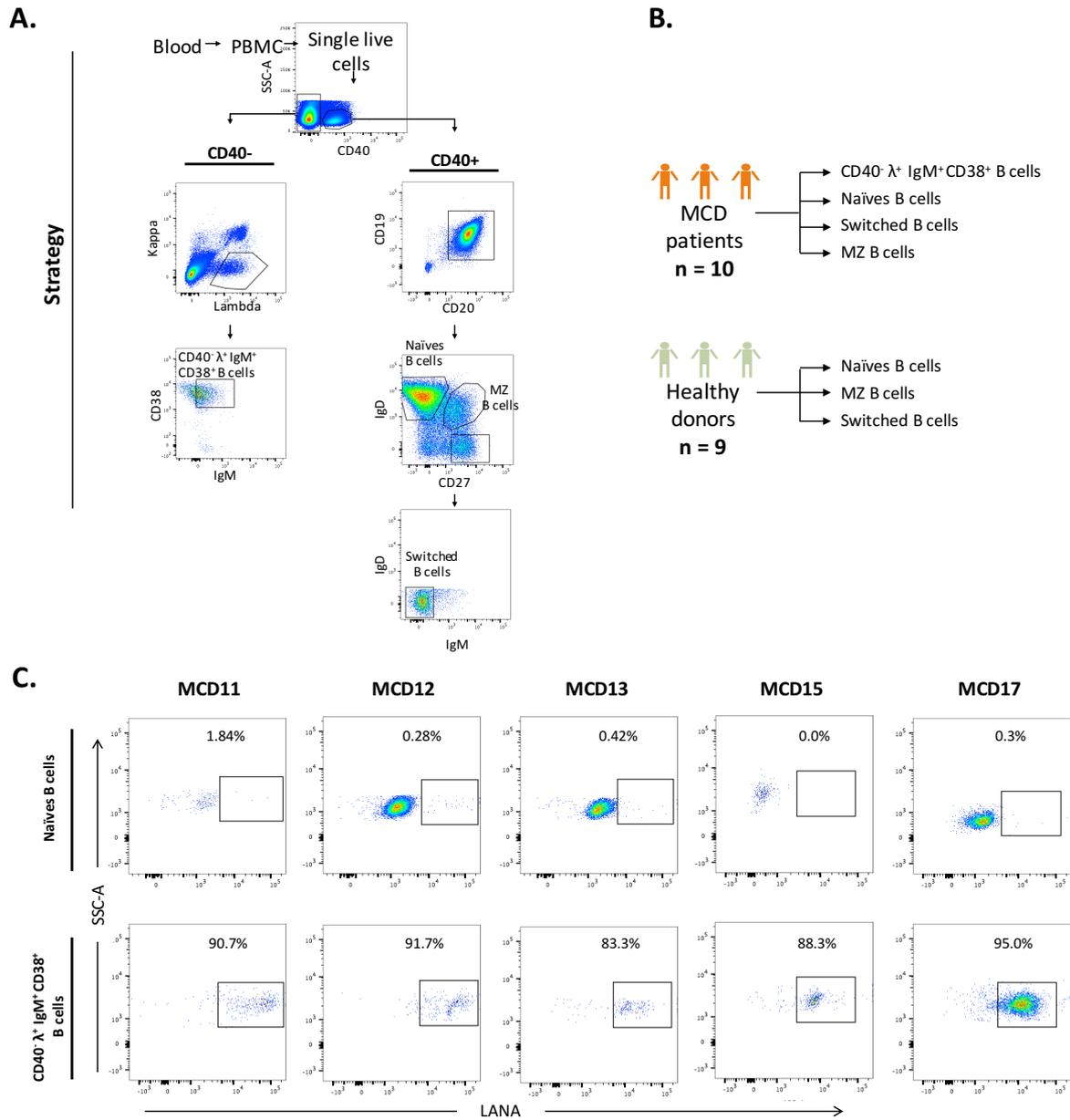


Figure 2. Schematic model summarizing the study design and cell sorting strategy. PBMCs from healthy donors or patients with HHV-8 MCD were surface stained with CD19, CD20, CD40, IgM, IgD, CD27, CD38, κ , and λ to sort LANA⁺ HHV-8-infected cells and B-cell subpopulations. **(A)** Schematic diagram depicts the cell types isolated from PBMCs of healthy donors and MCD Patients. **(B)** Sorting strategy for isolating HHV-8-infected cells (CD40⁻ λ⁺ CD38^{hi} IgM⁺ CD19^{low} CD20^{low}), Naïve (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD⁺), switched memory (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgM⁺ IgD⁻) and marginal zone (CD40⁺ CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD^{low}) B cells from PBMC, and FACS plots pre- and post-sorting are shown. **(C)** Re-analysis of sorted cells for LANA antigen expression. Representation of post-sort analysis of sorted CD40⁻ λ⁺ IgM⁺ CD38^{hi} and naïve B cells by dot plots.

Gene expression profiling defines LANA⁺ HHV-8-infected B cells from patients with HHV-8 MCD as a distinct entity

To obtain a comprehensive molecular understanding of circulating LANA⁺ HHV-8-infected B cells, rather than taking a single-gene approach to analyze HHV-8 cellular modulation genes process, we utilized a genome-wide gene expression profiling approach to measure the cellular transcriptomic changes in LANA⁺ HHV-8-infected B cells.

We performed principal component analysis (PCA) process control, based solely on the distribution of the measurements, to detect and exclude outliers from microarray data sets. After the exclusion of outliers, a total of 64 samples were included in the analyses, including total PBMCs, naïve, switched memory, and marginal zone B cells from healthy donors as well as PBMCs, naïve, switched memory, marginal zone B cells, and HHV-8-infected cells from patients with HHV-8 MCD.

To determine the relationship between LANA⁺ HHV-8-infected B cells and B cell subpopulations from healthy donors and patients with HHV-8 MCD, an unsupervised PCA was performed using the most variable 1596 genes across the 64 samples (Figure 3). The information retained in PC#1 x-axis is independent of that retained in PC#2 y-axis and these 2 first principal components accounted for 43.7% of the total variability (28.7% for PC#1 and 15% for PC#2). Three cell populations can be clearly distinguished from one and the other with this 2-dimensional representation. LANA⁺ HHV-8-infected cells transcriptome profile of patients with HHV-8 MCD is clearly segregated from total PBMCs and B cell subpopulations from both healthy donors and patients with HHV-8 MCD (Figure 3). Similarly, the unsupervised hierarchical clustering revealed that all LANA⁺ HHV-8-infected B cells were grouped within one cluster, presenting with relatively homogeneous gene expression profiles (Figure S3), implying that, regarding their gene expression, LANA⁺ HHV-8-infected B cells represent a distinct group among the various B cell subpopulations analyzed. Finally, it should be noted that the HIV-status of HHV-8-MCD patients did not affect the clustering (Figure S3).

The 1596 genes variably contributed to the definition of the two first principal components, according to the definition computed by PCA analysis (supplementary data in Table S3 and S4). To assign a meaning to PC#1 component, we considered the first 50 genes showing the highest positive coefficient (Table 2). These genes include CD19, CD20, CXCR5, BLK, CD22, CD79a/b, showing that PC#1 is mostly related to B cell identity. PC#2 y-axis mainly segregated LANA⁺ HHV-8-infected B cells from other B cell subpopulations.

We next identified genes that were differentially expressed in LANA⁺ HHV-8-infected B cell subpopulations as compared to the other B cell subpopulations of naïve, switched memory and marginal zone B cells.

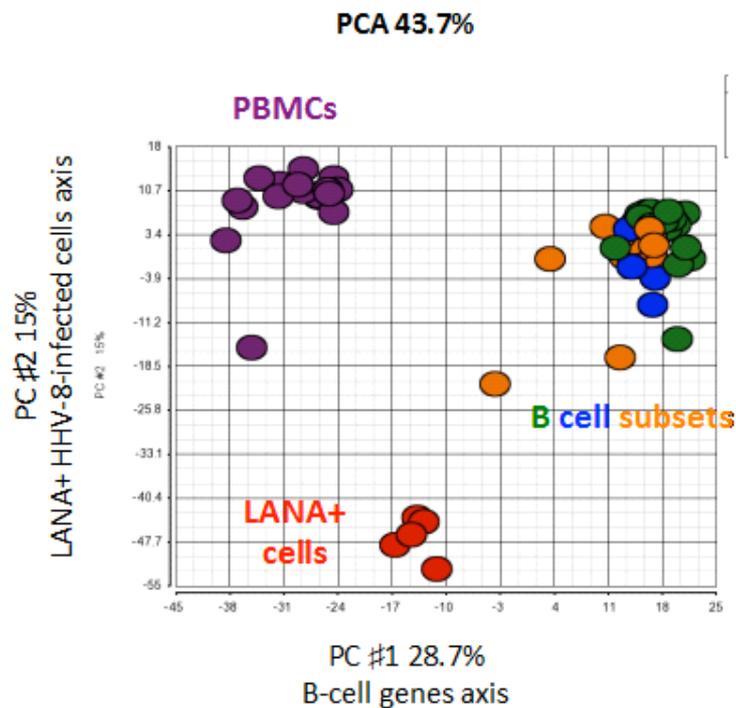


Figure 3. Unsupervised principal component analysis. PCA of the 1596 genes with the highest SD among the 64 samples. HHV-8-infected B cells from MCD patients exhibit a distinct transcriptome profile. The separation of the Different groups of samples was visualized on a 2-dimensional plot. The coordinates of each sample correspond to its principal component scores.

Table 2. Top 50 genes contributive for PC1 component

| Probe set | Name | Probe set | Name |
|---------------------|-----------|--------------------------|-----------|
| B cell genes | | Total PBMCs genes | |
| 7330333 | ADAM28 | 6520215 | ANXA1 |
| 3890400 | CXCR5 | 7550484 | SRGN |
| 1780440 | CD79A | 1770152 | MS4A6A |
| 2340753 | TNFRSF13C | 4810341 | CST7 |
| 6180491 | ADAM28 | 3800047 | AIF1 |
| 2850286 | C13orf18 | 520360 | MS4A6A |
| 4010139 | BANK1 | 1660296 | ID2 |
| 3190521 | MS4A1 | 2810315 | S100A6 |
| 6200753 | SWAP70 | 3420612 | GZMA |
| 3450338 | HLA-DOB | 2450427 | NKG7 |
| 380201 | STAP1 | 670369 | CD8A |
| 5260333 | C13orf18 | 1850523 | GZMB |
| 130646 | RALGPS2 | 360500 | SRGN |
| 7570184 | LOC283663 | 60470 | STX11 |
| 1450292 | WDFY4 | 730047 | SERPINA1 |
| 6760593 | OSBPL10 | 6380484 | SERPINA1 |
| 5870274 | FAM129C | 1260086 | ID2 |
| 290441 | QSOX2 | 10639 | RASSF4 |
| 1010754 | CD22 | 6660398 | FCN1 |
| 1940010 | MS4A1 | 3310538 | CD36 |
| 6250630 | RALGPS2 | 270338 | TRAT1 |
| 6400072 | C10orf64 | 2470017 | LILRB3 |
| 6580450 | BCL11A | 3460008 | TMEM173 |
| 7330504 | BCL11A | 6400333 | CTLA4 |
| 1190519 | MS4A1 | 2370010 | GZMH |
| 6770070 | FCRL2 | 5910113 | VCAN |
| 3940504 | CD79A | 3870324 | CPVL |
| 4200452 | HLA-DOA | 1440750 | S1PR5 |
| 5290647 | CXCR5 | 2070037 | ICOS |
| 3930326 | LOC728014 | 4890722 | CD28 |
| 7210136 | CD19 | 3170601 | CLEC12A |
| 2370070 | RUNDC2C | 7570673 | UPP1 |
| 6330471 | BLK | 4670193 | PRF1 |
| 1300139 | GNG7 | 3610719 | SAMD3 |
| 4640768 | VPREB3 | 3170128 | CD8A |
| 2030450 | ANGPTL1 | 3370594 | LILRA2 |
| 5080601 | COBLL1 | 1580088 | HCST |
| 770167 | CD79B | 5490408 | CEBPD |
| 5270372 | RALGPS2 | 3440754 | IL32 |
| 4290243 | ARHGAP24 | 6370369 | CD14 |
| 2510672 | TCF4 | 1090474 | CD3G |
| 650753 | AFF3 | 6330091 | CD7 |
| 4760601 | LOC728014 | 6770711 | CD4 |
| 6040390 | RUNDC2A | 2260129 | MS4A6A |
| 4920670 | PLEKHG1 | 2060440 | MAFB |
| 4260725 | CD79B | 4560088 | LOC439949 |
| 6380301 | FCRL1 | 7650433 | TIMP1 |
| 3800373 | CD37 | 290402 | IL2RB |
| 3170440 | BCL11A | 2060291 | STOM |
| 2450400 | RASGRP3 | 5890414 | FYB |

The 50 genes with the highest positive PC1 coefficients (B cell genes) and the 50 genes with the highest negative PC1 coefficients (Total PBMCs genes) are listed.

HHV-8-infected B cells from MCD patients are not related to other B cell subpopulations

First, we compared the gene expression profiles of naïve, switched memory and marginal zone B cells from patients with HHV-8 MCD with the genes differentially expressed in the same B cell subpopulations from healthy donors (216 DEG across B cell subpopulations from healthy donors, FDR>0.05) (Figure 4). This comparison of the three B cell subpopulations gene expression profiles from patients with HHV-8 MCD to those of healthy donors did not yield a different expression profile (Figure S4), thus allowing the use of the normal B cell subpopulations for subsequent analysis.

Then, to further define the phenotype of LANA⁺ HHV-8-infected B cells in relation to those of the major normal B cell subpopulations, we compared the gene expression profiles of LANA⁺ HHV-8-infected B cells to the genes that are differentially expressed in naïve, switched memory and marginal zone B cells (Figure 4). The comparison with the genes that distinguish the three normal B cell subpopulations as identified by supervised analysis, shows that LANA⁺ HHV-8-infected B cells are not related to naïve, switched memory or marginal zone B cells. It is of note, that the expression of all the genes that characterize normal B cell subpopulations was down regulated in LANA⁺ HHV-8-infected B cells. In contrast, LANA⁺ HHV-8-infected B cells expressed increased levels of a small number of genes involved in oncogenesis, such Cyclin D2 (CCND2, cellular homologue to vCyclin), TNF receptor superfamily member 13B (TNFRSF13B, coding for TACI), Annexin A2 (ANXA2), enolase superfamily member 1 (ENOSF1), minichromosome maintenance complex component 5 (MCM5), serpin family F member 1 (SERPINF1). Furthermore, 7 genes associated with plasmablast differentiation are also included in these increased genes.

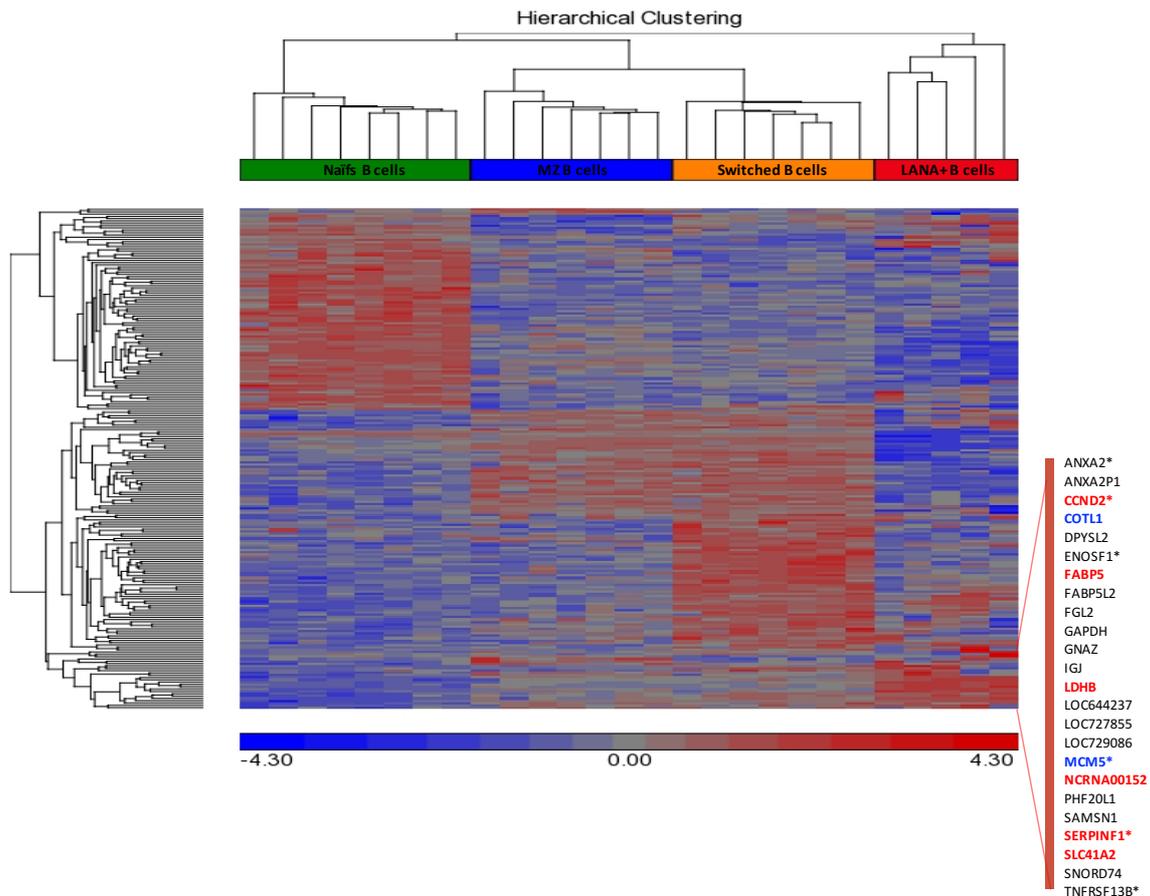


Figure 4. Relatedness of the gene expression profile of HHV-8-infected cells to normal B cell subpopulations. Heat map illustrating 216 significant differentially expressed genes (FDR<0.05) in normal B cell subpopulations (naïve, switched and marginal zone B cells). Red indicates increased expression and blue decreased expression relative to the median expression level according to the color scale shown.

The gene expression profile of LANA⁺ HHV-8-infected B cells shares features of HHV-8-infected plasmablasts in MCD lesions

We next examined which set of genes distinguishes the LANA⁺ HHV-8-infected B cells from the group comprising all the B cell subpopulations from healthy donors. To this purpose, we used supervised analysis to compare the gene expression profiles of LANA⁺ HHV-8-infected B cells with those of normal B cell subpopulations (naïve, memory switched and marginal zone B cells). Figure 5A shows that 502 genes are specifically expressed (or overexpressed; FC \geq 2 and FDR > 0.001), and that the expression of 641 genes is downregulated (FC \leq -2 and FDR > 0.001) in LANA⁺ HHV-8-infected B cells.

Among the genes specifically up- or down-regulated in LANA⁺ HHV-8-infected B cells, several are known to characterize MCD cells relative to other B cells, thus further confirming the validity of the gene expression profiles generated from the LANA⁺ HHV-8-infected B cell samples. These genes include the up-regulated CD38, IL10 and the plasma cell specific

transcription factors PRDM1/BLIMP-1 and IRF4 (Chadburn et al., 2008) and the down-regulated genes CD19, MS4A1 (coding for CD20), CD30, CXCR5, CD79a, CIITA and as well as B cell specific transcription factors PAX5 and Bcl6.

LANA⁺ HHV-8-infected cells have a plasmablastic cell expression profile and low expression of B cell markers

To further characterize the LANA⁺ HHV-8-infected cells, we performed a GSEA (Figure 5B) using well-defined gene signatures related to the different steps of the mature B cell and plasma cell differentiation programs, and summarized in Table 3 (Covens et al., 2013; Gutierrez et al., 2007; Jourdan et al., 2009; Tarte et al., 2002; Tarte et al., 2003). Consistent with the activity of PRDM-1/BLIMP-1 function as a repressor of the B cell program during plasma cell differentiation, we found that LANA⁺ HHV-8-infected B cells were negatively enriched for a gene signature related to PRDM-1/BLIMP-1 repressed genes set (NES = -3.02, FDR < 0.0). Accordingly, the LANA⁺ HHV-8-infected B cells were negatively enriched for gene signature related to the mature B cell differentiation program (B cell identity genes: CD19, CD20, CD79a, CD83, LTB, etc.) (NES = -3.45, FDR < 0.0). Moreover, LANA⁺ HHV-8-infected B cells were significantly enriched for a gene signature related to XBP-1 target genes (NES = 2.53, FDR = 0.0) which control synthesis and secretion of immunoglobulins characteristic of full plasma cell differentiation. Finally, we observed a significant enrichment of genes related to plasmablast differentiation (plasmablast genes: PRDM-1, XBP-1, IRF-4, IGJ, etc.) (NES = 3.69, FDR = 0.0). Furthermore, we observed a significant enrichment of genes expression profile which is up-regulated during an *in vitro* differentiation of memory B cell (IgM memory and class-switched memory) into plasmablast, reached by the fourth day of culture, concomitant with upregulation of IgM (Jourdan et al., 2009), a high level of Ki67 expression, and loss of CD27 expression on a fraction of the cells (NES = 2.56, FDR = 0.0). Taken together, these findings indicate that LANA⁺ HHV-8-infected B cells bear a plasmablastic gene expression program.

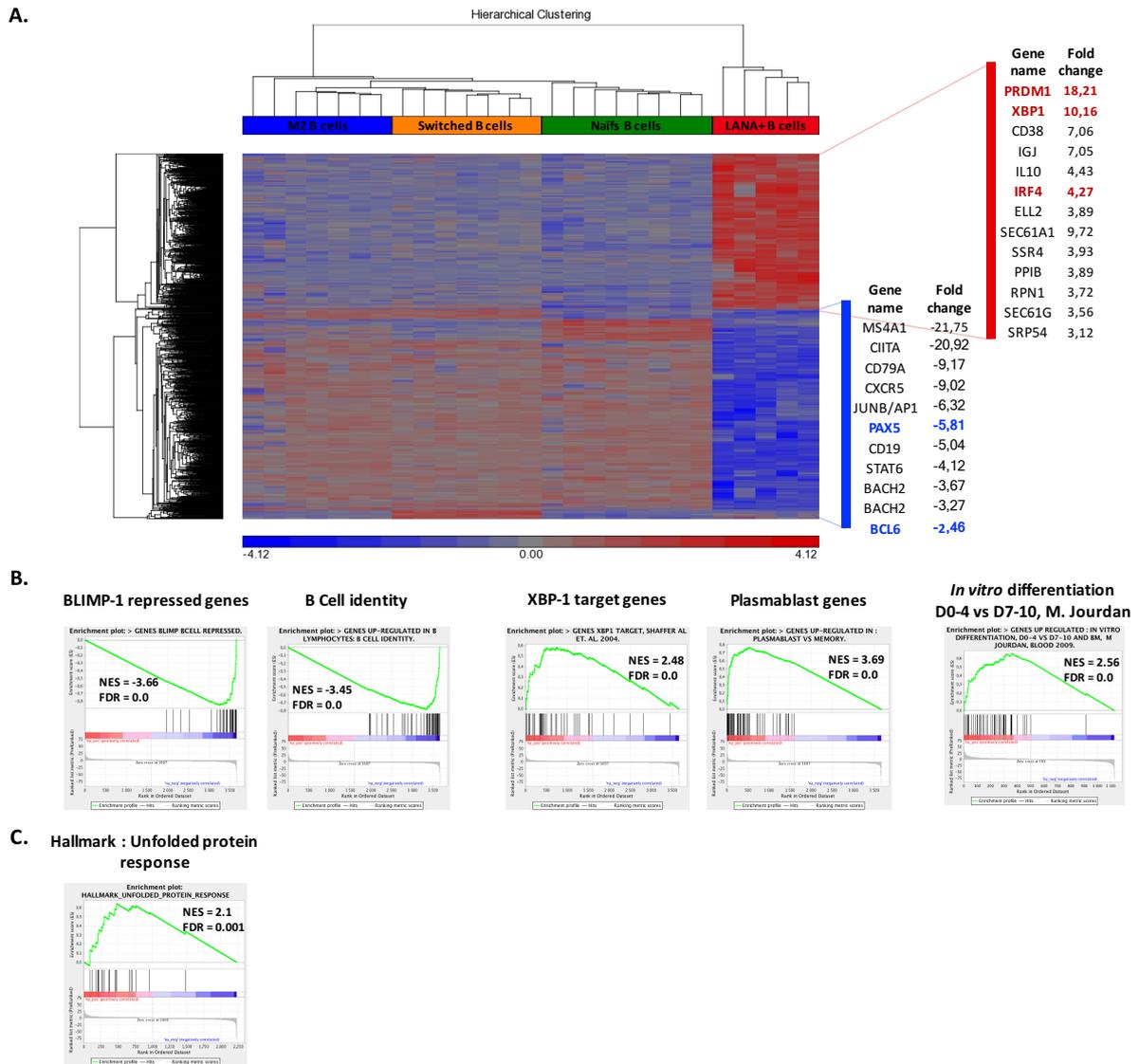


Figure 5. Transcriptome analysis of blood HHV-8-infected B cells from MCD patients. (A) Heat map illustrating 1275 significant differentially expressed genes (FDR<0.001) in MCD HHV-8-infected B cells compared with normal B cell subpopulations (Naïve, Switched and Marginal Zone B cells). Red indicates increased expression and blue decreased expression relative to the median expression level according to the color scale shown. **(B)** GSEA analysis on preranked lists using customized gene sets described in « Materials and methods ». HHV-8-infected MCD cells are negatively enriched in B cell identity and BLIMP-1 repressed genes and positively enriched in plasmablast signature and XBP-1 target genes. **(C)** HHV-8-infected MCD cells are negatively enriched in related unfolded protein response genes. GSEA graphs illustrate the cumulative enrichment score in each specific gene signature comparison. Normalized enrichment scores (NES) and false-discovery rate (FDR) are shown for each displayed analysis. Statistical significance is considered when FDR < 0.0.

The unfolded protein response (UPR) is activated in *LANA⁺ HHV-8-infected B cells*

UPR is activated in response to an accumulation of unfolded or misfolded proteins in the endoplasmic reticulum to restore normal function of the cell by halting protein translation, degrading misfolded proteins, and activating the signaling pathways that lead to increasing the production of molecular chaperones involved in protein folding.

The UPR is strongly induced in *LANA⁺ HHV-8-infected B cells* (NES = 2.56, FDR = 0.0) (Figure 5C). The up-regulated UPR components genes comprise SEC61A1, SSR4, PPIB, RPN1 SEC61G and SRP54 (Figure 5A), that are activated by ATF6 during ER stress. These results indicate that the UPR is activated in *LANA⁺ HHV-8-infected B cells*.

Table 3. B cell differentiation gene signatures in *LANA⁺ HHV-8-infected B cells* and B cell subpopulations.

| <i>Gene Signature</i> | Enrichment in | | | |
|---|--|-----|------------------------------|-----|
| | <i>LANA⁺ HHV-8-infected B cells</i> | | Normal B cell subpopulations | |
| | NES | FDR | NES | FDR |
| Blimp-1 target repressed genes | | | -3.66 | 0.0 |
| B cell identity (1) | | | -3.45 | 0.0 |
| XBP-1 target genes | 2.48 | 0.0 | | |
| Plasmablast genes (2 - 3 - 4 - 5) | 3.69 | 0.0 | | |
| B cells <i>in vitro</i> Differentiation D0-4 vs D7-10 (4) | 2.56 | 0.0 | | |

GSEA was used to test for significant enrichment of defined gene signatures related to different steps of the mature B cell and plasma cell differentiation programs. NES and FDR P-val are shown. Significance is considered when FDR<0.05. Gene signatures of B cell differentiation were extracted from data of References 1-5 or downloaded from <http://lymphochip.nhi.gov/signaturedb/index.html>.

(1) Guitierrez, *Leukemia* 2007; (2) Tarte, *Blood* 2002; (3) Tarte, *Blood* 2003; (4) Jourdan, *Blood* 2009; (5) Covens, *Blood* 2013

LANA⁺ HHV-8-infected B cells proliferate and evade the immune system

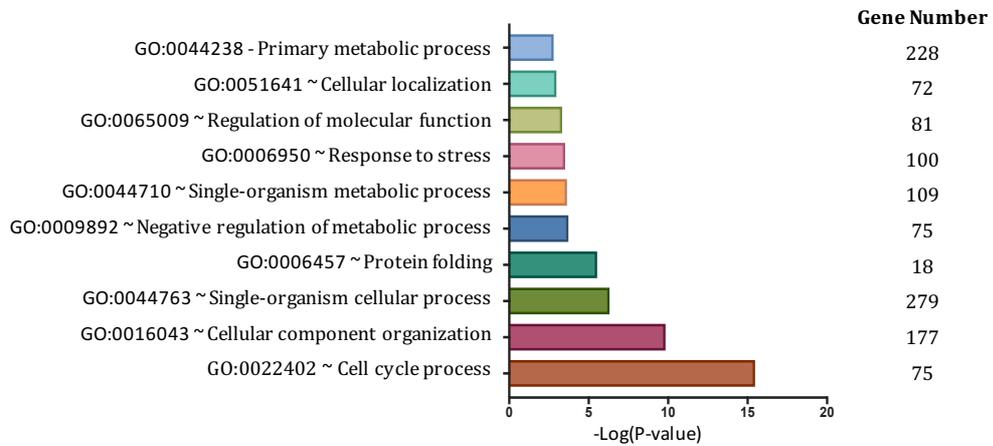
To gain further insight into the biological processes in which these genes may be involved, we used the database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID). We found that many of the 502 genes whose expression was induced in MCD *LANA⁺ HHV-8-infected B cells* were associated with gene ontology (GO) biological processes such as cell cycling (P-value = $3.4 \cdot 10^{-16}$), protein folding (P-value = $2.9 \cdot 10^{-6}$), and to stress response (P-value = $3.0 \cdot 10^{-4}$) (Figure 6A). We ran a gene set enrichment analysis (GSEA) using the MSigDB

Hallmark gene category on LANA⁺ HHV-8-infected B cells gene signature. After filtering for Hallmark gene sets that met the P value and FDR cutoff, GSEA revealed that E2F transcription factor targets were among the most enriched gene set in MCD LANA⁺ HHV-8-infected B cells (NES = 2.52, FDR = 0.0) confirming that MCD LANA⁺ HHV-8-infected B cells undergo excessive proliferation (Figure 6B).

Cell proliferation needs to be metabolically supported and mTORC1 has been shown to be a major regulator of cellular metabolism. Consistent with this, the GSEA analysis show that MCD LANA⁺ HHV-8-infected B cells were significantly enriched for gene signature related to oxidative phosphorylation, fatty acid metabolism and glycolysis (NES = 2.23, FDR = 0.001; NES = 1.76, FDR = 0.004; and NES = 1.16, FDR = 0.41, respectively) (Figure 6C).

A.

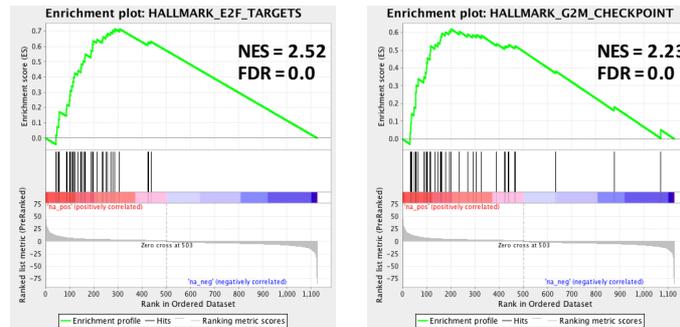
**GO Biological Process induced in MCD
HHV-8-infected B cells**



B.

Hallmark : E2F targets

Hallmark : G2M checkpoint



C.

Hallmark : Oxidative phosphorylation

Hallmark : Fatty acid metabolism

Hallmark : Glycolysis

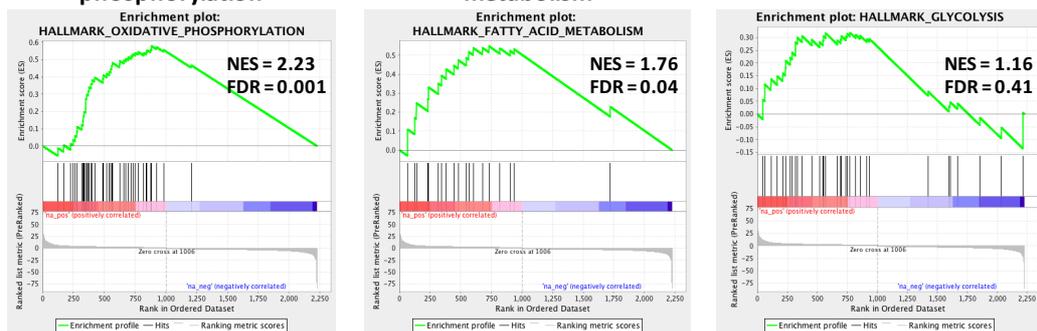


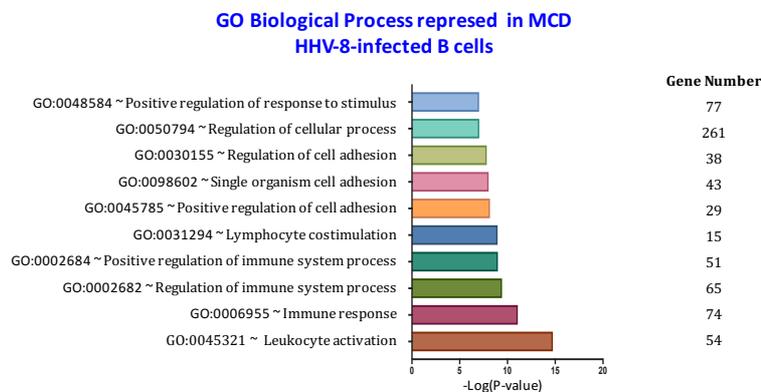
Figure 6. HHV-8-infected B cells proliferate and evade the immune system. (A) DAVID functional annotation of the 502 genes specifically expressed (or overexpressed; FC > 2 and FDR > 0.001). The 10 most significant (P<0.05) biological process Go terms, their P value, enrichment score, and gene count are shown. Gene Ontology (GO) analysis of differentially modulated genes classified by their biological functions and arranged according to their statistical significance (-log (P-value) indicated on x axis) from DAVID. **(B)** Microarray data were analyzed using GSEA software to identify functionally related groups of genes (gene sets) with statistically significant enrichment. The figure shows the enriched genes for: E2F targets and G2M checkpoint set. **(C)** The figure shows the enriched genes for: Oxidative phosphorylation, Fatty acid metabolism and Glycolysis set.

In contrast, the 641 genes differentially down regulated expressed genes in MCD LANA+ HHV-8-infected B cells were associated with two main gene ontology (GO) biological processes: immune-related (P-value = $8.2 \cdot 10^{-12}$) and adhesion molecules (P-value = $6.8 \cdot 10^{-9}$) genes (Figure 7A).

We ran a gene set enrichment analysis (GSEA) using the MSigDB Hallmark and GO biological processes gene categories on LANA⁺ HHV-8-infected B cells gene signature. GSEA revealed that IL2 STATS signaling (NES = -1.91, FDR = 0.02), IFN gamma response (NES = -1.89, FDR = 0.01), and Antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II (NES = -2.06, FDR = 0.01) were the most downregulated gene set in MCD LANA⁺ HHV-8-infected B cells confirming that MCD LANA⁺ HHV-8-infected B cells are escaping the immune system control (Figure 7B).

Altogether, these findings indicate that LANA⁺ HHV-8-infected B cells are undergoing an uncontrolled proliferation and are escaping the immune system.

A.



B.

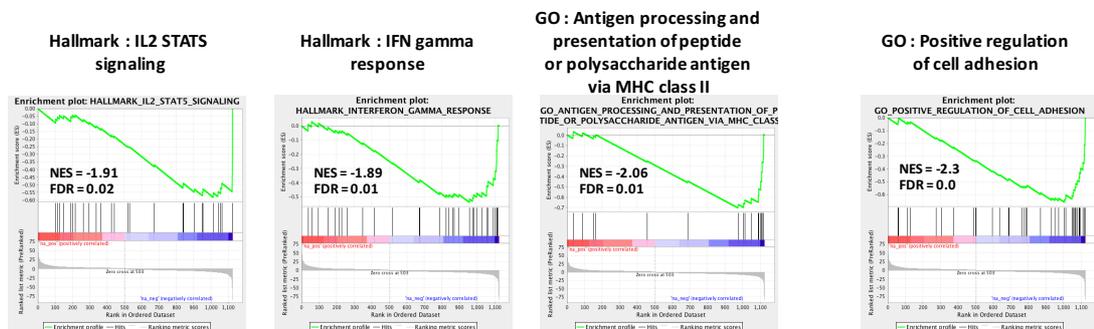


Figure 7. HHV-8-infected B cells evade the immune system. (A) DAVID functional annotation of the 641 genes specifically downregulated ($FC < -2$ and $FDR > 0.001$). The 10 most significant ($P < 0.05$) biological process Go terms, their P value, enrichment score, and gene count are shown. Gene Ontology (GO) analysis of differentially modulated genes classified by their biological functions

and arranged according to their statistical significance ($-\log(P\text{-value})$ indicated on x axis) from DAVID. **(B)** Microarray data were analyzed using GSEA software to identify functionally related groups of genes (gene sets) with statistically significant enrichment. The figure shows the enriched genes for: IL2 STATS signaling, IFN gamma response, Antigen processing and presentation, and positive regulation of cell adhesion set.

Discussion

HHV-8 related Multicentric Castleman Disease (HHV-8 MCD) is a rare atypical life-threatening B cell lymphoproliferative disorder associated with monocytic IgM/ λ HHV-8-infected plasmablasts morphologically and histologically vastly different from all known B-cell tumors or normal B cells. In the present study, we report for the first time that HHV-8 MCD is associated with circulating HHV-8 infected B cells and characterized these cells at a transcriptomic level.

The circulating HHV-8-infected B cells detected by flow cytometry during the flare of the disease, share the typical phenotype of the HHV-8-infected plasmablasts characterized by immunocytochemistry in HHV-8 MCD lesions. As LANA antigen is constitutively expressed in all HHV-8-infected cells and had been targeted in immunohistochemistry analysis to detect HHV-8-infected cells, we chose this antigen for flow cytometry staining.

The identification of HHV-8-infected B cells in blood samples is of major interest. From a clinical point of view, this may represent a particularly helpful diagnosis tool to rapidly establish the diagnosis of HHV-8 MCD. Moreover, this could lead to reconsider the classification of HHV-8 related lymphoproliferative disorders. To date, the diagnosis of HHV-8 MCD is based on clinical and histological criteria, meaning that a typical histology is compulsory to retain this diagnosis. The identification of HHV-8 MCD characteristic cells in blood samples from patients, could lead to unify HHV-8-related lymphoproliferative disorders.

The flow cytometric analysis of the MCD HHV-8-infected B cells has enabled us to extensively characterize them. The determination of their phenotype (IgM⁺, IgD⁻, λ ⁺, CD20⁻, CD19^{low}, CD27^{+/-}, Ki67⁺, CD38^{high}, CD138⁻), confirms the hypothesis that circulating HHV-8-infected B cells correspond to the pathologically HHV-8-infected plasmablasts described in lymphoid tissues (Chadburn et al., 2008; Du et al., 2001; Dupin et al., 2000). We then extended this phenotype by analyzing the expression of six molecules of the SLAM Family of immunoreceptors and their pattern of expression is similar to the one observed on normal plasmablasts (De Salort et al., 2011). On the other hand, the analysis of antigen-presenting and costimulatory molecules shows a deeply decreased expression of CD40 molecule. There is little information in the literature concerning CD40 expression on the surface of plasmablasts, but it is overall expected to be positive. Hence, this raises the possibility that the low expression of CD40 on LANA⁺ IgM⁺ λ ⁺ cells could reflect some mechanism of viral induced immunomodulation. As CD40/CD40 Ligand interaction is compulsory for the proper

establishment of germinal centers, for the acquisition of Somatic Hypermutations and for Isotype switching, the lack of expression of CD40 on HHV-8-infected plasmablasts may be of particular interest (Bishop, 2012). Indeed, atrophy of germinal centers is a cardinal feature of CD histology. Moreover, although these cells have a mature phenotype, they were shown to lack somatic hypermutations. At last, the observation that they constantly express an IgM heavy chain of immunoglobulin indicates that they haven't undergone isotype switching. All these features indicate that the HHV-8-infected plasmablasts have acquired their mature phenotype in a T cell independent manner. The low expression of CD40 on these HHV-8 plasmablasts could be one of the factors preventing these cells to interact properly with cognate CD4 T cells.

We then performed transcriptional analysis to improve the understanding of the very particular phenotype of these HHV-8-infected B cells. Because of the nuclear expression of LANA, the first challenge was to establish a reliable process for their identification and sorting. To this aim, we took advantage of their phenotypic characterization ($CD40^- \lambda^+ IgM^+ CD38^{high}$). All the sorted $CD40^- \lambda^+ IgM^+ CD38^+$ B cells with purity greater than 95%, expressed LANA which was sufficient for bulk transcriptomic analysis.

Gene expression profile analysis showed that MCD HHV-8-infected B cells displayed a homogeneous and characteristic gene expression profile that is clearly distinct from all the normal B cell subpopulations and shares features of HHV-8-infected plasmablasts in MCD lesions ($Blimp1^+ IRF4^+ Bcl6^- Pax5^-$) as described by Chadburn and al., thus further confirming the validity of our transcriptomic analysis (Chadburn et al., 2008).

The plasmablastic cell expression profile of the HHV-8-infected B cells was confirmed by Gene Set Enrichment Analysis. This finding is consistent with high expression of PRDM1/Blimp-1, XPB1 and IRF4 genes, transcription factors that are critical regulators promoting plasma cell differentiation, observed in all analyzed HHV8-infected B cells. Otherwise, the low expression of mature B cell genes observed also demonstrates that MCD HHV-8-infected cells are engaged in plasmablastic differentiation controlled by PRDM1/Blimp-1. This finding is consistent with low expression of PAX-5 gene, a transcription factor that inhibits plasma cell development by repressing PRDM1/blimp-1 and XBP-1 (Nutt et al., 1999).

Altogether, these findings indicate that MCD HHV-8-infected B cells are engaged in plasmablastic differentiation and that HHV-8 may act to direct B cells toward a plasmablast fate. Plasmablast differentiation, including that of IgM memory B cells, can result from NFkB activation by v-FLIP during latency. However, we did not observe an activation of NFkB

signaling pathway in MCD HHV-8-infected B cells. Conversely, although IL6 gene expression is decreased in MCD HHV-8-infected B cells, HHV-8 encoded IL6 homologue (vIL6) can induce the expression of XBP-1, as is the case for its human counterpart (Jenner and Boshoff, 2002) and promote plasmablasts differentiation (Wen et al., 1999). We also observed that HHV-8-infected B cells overexpress genes of UPR that connect ER stress to plasma cell differentiation and Ig secretion through XBP-1 expression. XBP-1 expression is also associated with HHV-8 reactivation from latency (Wilson et al., 2007). Hence, the UPR may be triggered because of the production of secreted Ig or of new virions. Then expression of the viral protein RTA must be examined to determine if the cells are latently infected or undergoes lytic replication.

In addition, our data show that HHV-8-infected B cells express increased levels of genes characteristic of tumor cell profile including proliferation signaling, evasion of growth suppression, deregulation of cellular energetics, and avoidance of immune recognition. Indeed, a plethora of HHV-8 proteins prolong the life of the infected cell by altering cellular signaling and successfully grant invisibility from immune recognition (Bhatt and Damania, 2012). First, GO analyses identified that genes most able to define MCD HHV-8-associated B cells by their overexpression are involved in cell cycle and proliferation. FACS analysis confirms the high expression of Ki67 in MCD HHV-8-associated B cells. Such characteristics are similar to those reported in PEL. Second, genes that are the most down regulated in MCD HHV-8-associated B cells are involved in immune response and adhesion. Indeed, as a sophisticated oncogenic virus, HHV-8 has evolved to possess a large repertoire of potent mechanisms for either outwitting or adopting the host's immune responses with almost 50% of KSHV genome is dedicated to modulating host immune response. Third, HHV-8 infected B cells show deregulation of cellular energetics. Indeed, several genes involved in ATP synthesis also show increased expression in these cells, which is consistent with the increased amounts of energy required for secretory protein biogenesis. To our knowledge, such metabolic alterations have mostly been reported in studies of in vitro infected endothelial cells. Our results clearly report for the first time that such alteration occurs in vivo MCD HHV-8-infected B cells.

Our results further confirm the unique phenotype of this disease, and greatly extend the characterization of MCD.

Supplemental methods, tables and figures

Identification of circulating HHV-8-infected B cell specific genes in patients with Multicentric Castleman Disease by gene expression profiling

SBIHI Z. et al.

Supplemental Methods

Supplemental Tables

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figures

Supplemental Methods

LANA detection by flow cytometry in BC-3 cell line

Intracellular staining was performed after cells fixation and permeabilisation using FoxP3 staining kit from eBiosciences. Antibodies used were: anti-LANA (BD Biosciences, San Jose, CA). The optimal dilution of the anti-LANA alexa Fluor 647-conjugated mAb was determined by staining BC-3 cells with either conjugated anti-LANA mAb or conjugated isotype control. The optimal dilution to stain 1.10^5 BC-3 cells was 1/50, allowing the staining of 92% of the BC-3 cells (Figure S1).

Supplemental Tables

Supplemental Table 1: HHV-8 MCD patients' clinical data and laboratory characteristics.

| Patients | Sample | Age (years) | Gender | HIV | MCD status | KS | HHV-8 load, log ₁₀ /10 ⁶ cells | HHV-8 LANA+ cells % |
|----------|--------|-------------|--------|-----|------------|----|--|---------------------|
| MCD19 | P | 86 | M | - | NA | + | 4 | Absent |
| MCD20 | P | 58 | M | - | R | - | 4.42 | Absent |
| MCD21 | P | 37 | M | + | R | - | <100cop | Absent |
| MCD22 | P | 48 | F | + | R | + | 3.92 | Absent |
| MCD23 | P | 29 | M | + | A | - | 5.8 | Absent |
| MCD24 | P | 48 | F | + | R | + | 4.19 | Absent |
| MCD25 | P | 48 | M | + | A | - | 5.7 | Absent |
| MCD26 | P | 83 | M | - | NA | NA | NA | Absent |
| MCD27 | P | 52 | M | NA | NA | NA | NA | Absent |
| MCD28 | P | 48 | F | + | R | + | 3.92 | Absent |
| MCD29 | P | 78 | M | - | R | - | <100cop | Absent |
| MCD30 | S | 61 | M | - | A | + | 4.18 | Absent |
| | P | | | | A | | 5.09 | Absent |
| MCD32 | S | 28 | M | + | A | + | 4.4 | Absent |
| | P | 29 | | | A | | 4.7 | Absent |

F, female; M, male; P, peripheral blood mononuclear cells; S, splenic mononuclear cells; A, active; R, remission; NA, not available.

Supplemental Table 2.

| Bead Chip_ID | Subjects | Sorted B cell subsets | HIV Statut | Quality control |
|--------------|----------|-----------------------|------------|-----------------|
| 3998479044_B | HD 1 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998479076_F | HD 2 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998479090_F | HD 3 | Marginal zone B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479104_B | HD 8 | Marginal zone B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479105_A | HD 9 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998479105_G | HD 10 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998498095_C | HD 4 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998498103_D | HD 6 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998498103_I | HD 7 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998479076_D | HD 2 | IgM only B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498103_B | HD 6 | IgM only B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498103_G | HD 7 | IgM only B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498103_L | HD 8 | IgM only B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479105_E | HD 10 | IgM only B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479044_A | HD 1 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479076_E | HD 2 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479090_E | HD 3 | Naïve B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498095_B | HD 4 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998498095_F | HD 5 | Naïve B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498103_C | HD 6 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998498103_H | HD 7 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479104_A | HD 8 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479104_L | HD 9 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479105_F | HD 10 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479076_C | HD 2 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479090_D | HD 3 | PBMCs | HIV- | Excluded |
| 3998498095_A | HD 4 | PBMCs | HIV- | |
| 3998498095_E | HD 5 | PBMCs | HIV- | Excluded |
| 3998498103_A | HD 6 | PBMCs | HIV- | |
| 3998498103_F | HD 7 | PBMCs | HIV- | |
| 3998498103_K | HD 8 | PBMCs | HIV- | |

| | | | | |
|--------------|--------|-------------------------|------|------------------------------------|
| 3998479104_J | HD 9 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479105_C | HD 10 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479105_D | HD 10 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479044_C | HD 1 | Switched memory B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479076_G | HD 2 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998479090_G | HD 3 | Switched memory B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498095_D | HD 4 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998498095_G | HD 5 | Switched memory B cells | HIV- | Excluded |
| 3998498103_E | HD 6 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998498103_J | HD 7 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998479104_C | HD 8 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998479105_B | HD 9 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998479105_H | HD 10 | Switched memory B cells | HIV- | |
| 3998479044_D | MCD 1 | LANA+ B cells | HIV+ | Excluded (HHV-8 primary infection) |
| 3998479044_K | MCD 2 | LANA+ B cells | HIV+ | |
| 3998479076_I | MCD 3 | LANA+ B cells | HIV+ | |
| 3998479090_B | MCD 4 | LANA+ B cells | HIV+ | |
| 3998479090_I | MCD 5 | LANA+ B cells | HIV+ | |
| 3998498095_K | MCD 10 | LANA+ B cells | HIV- | |
| 3998479044_H | MCD 2 | Marginal zone B cells | HIV- | |
| 3998479076_A | MCD 2 | Marginal zone B cells | HIV+ | |
| 3998479076_K | MCD 3 | Marginal zone B cells | HIV+ | |
| 3998479090_K | MCD 5 | Marginal zone B cells | HIV+ | Excluded |
| 3998479104_I | MCD 8 | Marginal zone B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479044_E | MCD1 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998479044_G | MCD2 | Naïve B cells | HIV- | |

| | | | | |
|--------------|--------|------------------------|------|------------------------------------|
| 3998479044_L | MCD 2 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998479076_J | MCD 3 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998479090_J | MCD 5 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998498095_I | MCD 6 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998498095_L | MCD 10 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479104_E | MCD 7 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479104_H | MCD 8 | Naïve B cells | HIV- | |
| 3998479105_J | MCD 9 | Naïve B cells | HIV+ | |
| 3998479044_F | MCD 2 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479044_J | MCD 2 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479076_H | MCD 3 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479090_A | MCD 4 | PBMCs | HIV+ | Excluded (HHV-8 primary infection) |
| 3998479090_H | MCD 5 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998498095_H | MCD 6 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479104_D | MCD 7 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479104_G | MCD 8 | PBMCs | HIV- | |
| 3998479104_K | MCD 5 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479105_I | MCD 9 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479105_K | MCD 6 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998498095_J | MCD 10 | PBMCs | HIV+ | |
| 3998479044_I | MCD 2 | Swiched memory B cells | HIV- | |
| 3998479076_B | MCD 2 | Swiched memory B cells | HIV+ | |
| 3998479076_L | MCD 3 | Swiched memory B cells | HIV+ | |
| 3998479090_C | MCD 4 | Swiched memory B cells | HIV+ | Excluded (HHV-8 primary infection) |
| 3998479090_L | MCD 5 | Swiched memory B cells | HIV- | |
| 3998479104_F | MCD 7 | Swiched memory B cells | HIV- | Excluded |
| 3998479105_L | MCD 9 | Swiched memory B cells | HIV+ | |

Supplemental Table 3: Top 50 genes contributive to the definition of PCA 1 component.

The 50 genes with the highest positive PC1 coefficients (B cell genes) and the 50 genes with the highest negative PC1 coefficients (Total PBMCs genes) are listed.

| Probe set | Name | PCA 1 Positif Coefficients | Probe set | Name | PCA 1 Negatif Coefficients |
|---------------------|-----------|----------------------------------|--------------------------|-----------|----------------------------------|
| B cell genes | | | Total PBMCs genes | | |
| 7330333 | ADAM28 | 0.908946 | 6520215 | ANXA1 | -0.936482 |
| 3890400 | CXCR5 | 0.905048 | 7550484 | SRGN | -0.932512 |
| 1780440 | CD79A | 0.877488 | 1770152 | MS4A6A | -0.929437 |
| 2340753 | TNFRSF13C | 0.874306 | 4810341 | CST7 | -0.924427 |
| 6180491 | ADAM28 | 0.872967 | 3800047 | AIF1 | -0.923941 |
| 2850286 | C13orf18 | 0.871817 | 520360 | MS4A6A | -0.91937 |
| 4010139 | BANK1 | 0.870836 | 1660296 | ID2 | -0.916729 |
| 3190521 | MS4A1 | 0.868455 | 2810315 | S100A6 | -0.91552 |
| 6200753 | SWAP70 | 0.866994 | 3420612 | GZMA | -0.912218 |
| 3450338 | HLA-DOB | 0.8629 | 2450427 | NKG7 | -0.911908 |
| 380201 | STAP1 | 0.861983 | 670369 | CD8A | -0.911151 |
| 5260333 | C13orf18 | 0.861222 | 1850523 | GZMB | -0.91105 |
| 130646 | RALGPS2 | 0.860226 | 360500 | SRGN | -0.910035 |
| 7570184 | LOC283663 | 0.856227 | 60470 | STX11 | -0.90739 |
| 1450292 | WDFY4 | 0.85563 | 730047 | SERPINA1 | -0.905974 |
| 6760593 | OSBPL10 | 0.844274 | 6380484 | SERPINA1 | -0.905845 |
| 5870274 | FAM129C | 0.838953 | 1260086 | ID2 | -0.903802 |
| 290441 | QSOX2 | 0.83821 | 10639 | RASSF4 | -0.903749 |
| 1010754 | CD22 | 0.83789 | 6660398 | FCN1 | -0.903267 |
| 1940010 | MS4A1 | 0.836622 | 3310538 | CD36 | -0.902958 |
| 6250630 | RALGPS2 | 0.835115 | 270338 | TRAT1 | -0.902451 |
| 6400072 | C10orf64 | 0.834594 | 2470017 | LILRB3 | -0.90128 |
| 6580450 | BCL11A | 0.831876 | 3460008 | TMEM173 | -0.900525 |
| 7330504 | BCL11A | 0.830697 | 6400333 | CTLA4 | -0.899935 |
| 1190519 | MS4A1 | 0.827125 | 2370010 | GZMH | -0.898804 |
| 6770070 | FCRL2 | 0.82366 | 5910113 | VCAN | -0.897725 |
| 3940504 | CD79A | 0.823222 | 3870324 | CPVL | -0.894343 |
| 4200452 | HLA-DOA | 0.812317 | 1440750 | S1PR5 | -0.893757 |
| 5290647 | CXCR5 | 0.81084 | 2070037 | ICOS | -0.891912 |
| 3930326 | LOC728014 | 0.809638 | 4890722 | CD28 | -0.89115 |
| 7210136 | CD19 | 0.808734 | 3170601 | CLEC12A | -0.891149 |
| 2370070 | RUNDC2C | 0.803074 | 7570673 | UPP1 | -0.891136 |
| 6330471 | BLK | 0.802077 | 4670193 | PRF1 | -0.889922 |
| 1300139 | GNG7 | 0.800879 | 3610719 | SAMD3 | -0.888741 |
| 4640768 | VPREB3 | 0.79529 | 3170128 | CD8A | -0.888151 |
| 2030450 | ANGPTL1 | 0.793756 | 3370594 | LILRA2 | -0.887749 |
| 5080601 | COBLL1 | 0.787279 | 1580088 | HCST | -0.885624 |
| 770167 | CD79B | 0.780724 | 5490408 | CEBPD | -0.884607 |
| 5270372 | RALGPS2 | 0.780585 | 3440754 | IL32 | -0.883704 |
| 4290243 | ARHGAP24 | 0.780553 | 6370369 | CD14 | -0.883671 |
| 2510672 | TCF4 | 0.779607 | 1090474 | CD3G | -0.882773 |
| 650753 | AFF3 | 0.779213 | 6330091 | CD7 | -0.882604 |
| 4760601 | LOC728014 | 0.774958 | 6770711 | CD4 | -0.881829 |
| 6040390 | RUNDC2A | 0.772127 | 2260129 | MS4A6A | -0.881498 |
| 4920670 | PLEKHG1 | 0.770888 | 2060440 | MAFB | -0.881268 |
| 4260725 | CD79B | 0.770571 | 4560088 | LOC439949 | -0.880517 |
| 6380301 | FCRL1 | 0.766719 | 7650433 | TIMP1 | -0.879013 |
| 3800373 | CD37 | 0.76205 | 290402 | IL2RB | -0.877706 |
| 3170440 | BCL11A | 0.761581 | 2060291 | STOM | -0.877463 |
| 2450400 | RASGRP3 | 0.761053 | 5890414 | FYB | -0.875014 |

Supplemental Table 4: Top 50 genes contributive to the definition of PCA 2 component.

The 50 genes with the highest positive PC2 coefficients and the 50 genes with the highest negative PC2 coefficients are listed.

| Probe set | Name | PCA 2 Positif Coefficients | Probe set | Name | PCA 2 Negatif Coefficients |
|---------------------------|--------------|----------------------------------|---------------------------|--------------|----------------------------------|
| Positive PC2 coefficients | | | Negative PC2 coefficients | | |
| 5050441 | ZEB2 | 0.921606 | 770682 | MGC29506 | -0.827972 |
| 2570112 | ABLIM1 | 0.880261 | 1010600 | LRR3 | -0.8142 |
| 6330341 | PARP8 | 0.845585 | 4670324 | LOC649203 | -0.811552 |
| 6280750 | | 0.835821 | 6020433 | C19orf45 | -0.806335 |
| 6560091 | TGFBR2 | 0.831476 | 4730632 | | -0.804706 |
| 2900441 | ZBTB4 | 0.829708 | 520070 | PML | -0.800026 |
| 5810411 | SNORD89 | 0.818905 | 3190692 | POLL | -0.787107 |
| 5490070 | TGFBR2 | 0.817844 | 4210397 | GLDC | -0.781313 |
| 1300280 | CXCR4 | 0.815545 | 520632 | UNC5C | -0.770561 |
| 7000142 | KIAA0430 | 0.814885 | 6840301 | NT5DC2 | -0.76905 |
| 3840554 | SPOCK2 | 0.813716 | 1510048 | LOC389124 | -0.768919 |
| 3840491 | PELI2 | 0.812803 | 2760328 | GJA8 | -0.765247 |
| 2100025 | RAB37 | 0.805258 | 240086 | PHGDH | -0.757661 |
| 2710575 | CD69 | 0.797703 | 5810113 | | -0.753797 |
| 4830674 | BEX2 | 0.784182 | 1400673 | CDCA5 | -0.753075 |
| 2650594 | ARHGAP9 | 0.777545 | 4560551 | MON1A | -0.746228 |
| 2120450 | | 0.775664 | 1260315 | PMM2 | -0.735165 |
| 3940148 | CHMP1B | 0.771942 | 6060189 | C14orf105 | -0.730991 |
| 5310053 | LTB | 0.771682 | 7650039 | LOC144776 | -0.72919 |
| 5420091 | LTB | 0.763172 | 830075 | PKN1 | -0.729185 |
| 2260524 | SNORA5A | 0.761053 | 5810703 | HMGCLL1 | -0.728951 |
| 2810246 | LBH | 0.760307 | 7330189 | REEP2 | -0.726672 |
| 6620392 | LFNG | 0.758419 | 630270 | C5orf45 | -0.72499 |
| 3180133 | MAX | 0.7581 | 2320170 | CDC45L | -0.72133 |
| 5960747 | TRIM22 | 0.751873 | 2320435 | LOC647585 | -0.716952 |
| 620152 | LOC147710 | 0.74736 | 5050053 | TXNDC5 | -0.716762 |
| 4040653 | LOC728855 | 0.746519 | 1240554 | TNFRSF17 | -0.715645 |
| 6760364 | LCOR | 0.744877 | 150168 | LOC100129412 | -0.71441 |
| 6620026 | CD83 | 0.739252 | 6770408 | MCM2 | -0.713334 |
| 5090440 | CDKN2AIP | 0.720341 | 6660026 | | -0.710028 |
| 5220240 | FTH1 | 0.719946 | 5050048 | LOC647055 | -0.709746 |
| 5390246 | CCR7 | 0.716657 | 6960240 | LOC100128960 | -0.708255 |
| 240156 | MORC3 | 0.715043 | 520220 | LOC651807 | -0.70579 |
| 6180176 | AES | 0.714092 | 5820754 | HIST1H2AJ | -0.704128 |
| 5270132 | CBLB | 0.712902 | 1450280 | NCAPG | -0.702884 |
| 5720541 | LOC100128485 | 0.711734 | 6770259 | FABP6 | -0.701905 |
| 1740433 | MSL3L1 | 0.709635 | 6180605 | | -0.70036 |
| 3060520 | LOC642073 | 0.708457 | 3130743 | FABP6 | -0.698461 |
| 6400364 | NR4A2 | 0.705279 | 6590224 | WFS1 | -0.696784 |
| 510341 | VEZF1 | 0.703424 | 5550543 | AKR1A1 | -0.694289 |
| 3130673 | SCARNA5 | 0.70333 | 3130121 | NTSR2 | -0.691392 |
| 2480192 | SES3 | 0.701512 | 6770026 | AURKB | -0.690904 |
| 4670382 | SCARNA17 | 0.700368 | 4670632 | LOC100129101 | -0.68962 |
| 2680097 | YPEL5 | 0.699736 | 4280632 | GAS6 | -0.68961 |
| 2850068 | LOC440280 | 0.699009 | 360189 | LOC100131653 | -0.68804 |
| 2060400 | NKTR | 0.69817 | 2470754 | LOC649858 | -0.687946 |
| 2570564 | HLA-DRA | 0.697584 | 6380280 | STOML3 | -0.687509 |
| 1070450 | PTGS1 | 0.697511 | 5910364 | TYMS | -0.681904 |
| 5310041 | TGFBR2 | 0.695449 | 4050242 | LOC642356 | -0.681808 |
| 270014 | GABBR1 | 0.694829 | 2850474 | KIF23 | -0.67578 |

Supplemental Table 5: Significantly enriched gene signatures by GSEA analysis

| | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----------|------------|------------|-----------|------------|----------|---------------|------------|-----------|------------|---------------|----------|----------|-----------|
| > Genes Blimp Bcell repressed. | | | | | | | | | | | | | | |
| AICDA | ALOX5 | ARHGDI1B | ATP2A3 | BCL6 | BLNK | BTK | CD180 | CD19 | CD22 | CD24 | CD27 | CD37 | CD52 | CD53 |
| CD74 | CD79A | CD86 | CIITA | CR2 | CXCR5 | DEK | EBF1 | FCER1G | FCER2 | FCRLA | GCET2 | GPR18 | HLA-DMB | HLA-DMB |
| HLA-DPA1 | HLA-DPB1 | HLA-DQA1 | HLA-DRA | HLA-DRB1 | IL16 | INPP5D | IRF8 | LRMP | LYN | MS4A1 | MYBL1 | MYO1E | NR1H2 | PAG1 |
| PAX5 | PCDHGC3 | PLEK | POU2AF1 | POU2F2 | RGS13 | RHOH | SP110 | SP140 | SPIB | ST6GAL1 | STAP1 | STAT6 | SYK | TANK |
| TLR10 | TRAF5 | VNN2 | VPREB3 | ZFP36L1 | | | | | | | | | | |
| > Genes up-regulated in B lymphocytes: B cell identity. | | | | | | | | | | | | | | |
| ABCB4 | ADAM28 | ADK | AIM2 | AKAP2 | ARMC3 | BANK1 | BEND5 | BIRC3 | BLK | C1QTNF7 | CACNA1A | CCR6 | CD19 | CD200 |
| CD22 | CD24 | CD37 | CD40 | CD72 | CD79A | CD79B | CNTNAP2 | CORO2B | CR2 | CXCR5 | EBF1 | EZR | FADS3 | FCER2 |
| FCRL1 | FCRL2 | FCRLA | GYTL1B | HIP1R | HLA-DOB | HLA-DQA1 | HRK | HVCN1 | ID3 | IFT57 | IGHG1 | IL4R | KCNQ1 | KIAA0040 |
| KIAA0125 | LARGE | LCN6 | MAP4K2 | METTL8 | MGC87042 | MS4A1 | MTSS1 | NT5E | OSBP10 | P2RX5 | P2RY10 | PAWR | PAX5 | PCDH9 |
| PDLIM1 | PFTK1 | PKHD1L1 | PLA2G4C | POU2AF1 | PPAPDC1B | QRSL1 | RASGRP3 | RP9 | SCN3A | SEMA4B | STAG3 | STAP1 | SWAP70 | SYCP3 |
| SYT17 | TNFRSF13C | TPD52 | VPREB3 | ZCCHC7 | ZNF777 | ZNF821 | | | | | | | | |
| > Genes XBP1 target, Shaffer AL et. al. 2004. | | | | | | | | | | | | | | |
| ACSS1 | ALDH1A1 | ARF3 | ATF6B | ATP2A2 | BMP6 | CD81 | CDKN3 | COPE | COX15 | CST3 | DAD1 | DDOST | DEGS1 | DNAJB9 |
| DNAJC10 | DNAJC3 | EDEM1 | ERGIC1 | FKBP14 | FNBP1 | FTL | FTSJ1 | GLRX | GPR89B | HERPUD1 | HM13 | HSP90B1 | HSPA5 | ISG20 |
| ITGAM | ITGB5 | LIPA | LMAN1 | MANF | MCFD2 | MGAT2 | MGC29506 | MOGS | OS9 | PDIA3 | PDIA4 | PDIA5 | PLOD1 | PPIB |
| PPP2CB | PRDX4 | RABAC1 | RBM7 | RHOQ | RNASE4 | RPN1 | SEC23B | SEC24C | SEC61A1 | SEC61G | SLC1A4 | SLC30A5 | SLC33A1 | SLC3A2 |
| SLPI | SPCS3 | SPOP | SRP54 | SRP9 | SRPR | SRPR | SSR1 | SSR3 | SSR4 | ST6GALNAC4 | SYVN1 | TMED10 | TRAM1 | TXNDC5 |
| UAP1 | USO1 | | | | | | | | | | | | | |
| > Plasmablast genes, Keis Covens Blood 2013, K. Tarte Blood 2002 and 2003. | | | | | | | | | | | | | | |
| PRDM1 | SLAMF7 | MKI-67 | TNFRSF17 | SEMA4A | HIST1H3B | BUB1 | APOBEC3B | DCAF12 | TYMS | IGKV6-21 | IGKV2-40 | KIAA0101 | TRIB1 | FND3B |
| CD38 | HPGD | AQP3 | SLC1A4 | NUCB2 | SLC7A11 | NT5DC2 | CCNB2 | HRASLS2 | SLCO3A1 | DLGAP5 | XBP1 | SPN | ASPM | GLDC |
| V3-3 | TOP2A | RRM2 | PSAT1 | HIST1H2BB | TP63 | ELL2 | ALDH1L2 | GPRC5D | GAB1 | ESCO2 | MGC29506 | MANEA | MYBL2 | DTL |
| MAN1A1 | ITGA6 | TPX2 | DENND2C | SKA3 | CDC6 | HIST1H1B | BMP8B | GPRIN3 | FKBP11 | IGLV6-57 | VDR | SLC44A1 | PDIA4 | GRCh37:15 |
| ELL2 | TNFRSF17 | CDK1 | LEF1 | WARS | SEC11C | IGKV2-24 | PDIA5 | k constant | SLC4A12 | CDC20 | HSPA13 | SEC24D | NCAPG | RCC1 |
| GRCh37:2 | GPR155 | NCRNA00152 | C14orf145 | CDKN3 | CASP3 | WIPI1 | MGC:178074 | HIST1H3F | HIST1H2AJ | SELS | BHLA15 | LDLR | CENPF | PLK1 |
| NUSAP1 | RUNX2 | SELPLG | HIST1H3J | CAV1 | NCRNA00152 | C17orf28 | KIF23 | CNKSR1 | IL2RB | | | | | |
| > B cells in vitro differentiation, D0-4 vs D7-10 and BM. | | | | | | | | | | | | | | |
| MKI-67 | CD27 | CD43 | CCR10 | CD62L | PRDM1 | XBP1 | IRF4 | CD27 | CD38 | CD31/PECAM | CCR10 | ITG4 | ITGB1 | ICAM2 |
| ERN1 | ITGAL | BHLHB3 | IFIT1 | ITGA6 | LAMP3 | AMPD1 | VCAM1 | CD38 | SDC1 | RSAD2 | CAV1 | LOC12960 | SLC44A1 | G1P3 |
| SLAMF7 | IGKV1-5 | NUCB2 | G1P2 | CCPG1 | IGHD | TNFSF10 | IGHA1 /// IGH | EAF2 | FND3B | CD59 | IGHG1 /// IGH | EPOR | SERPINI1 | FCRL5 |
| CECR1 | MX1 | ICAM2 | PRDX4 | KLHL6 | OAS1 | MANEA | IRF7 | IFI35 | XBP1 | FKBP11 | STAT1 | PECAM1 | PDK1 | LY96 |
| IGLV2-14 | LAMP2 | FND3A | FAM69A | LAX1 | TPST2 | GALNAC4S | SSR4 | SCARB2 | ADA | TPP1 | ARTS-1 | OAS2 | TLR7 | C1orf22 |
| TNFRSF7 | DUSP5 | MRPS31 | PRCP | PACAP | PRDM1 | ITM2C | CYBA | DKFZP586A | DNAJC1 | SEL1L | SEC24A | TNFRSF17 | SAR1B | GNS |
| CTSS | IL6ST | STAT2 | IFNAR2 | ISG20 | HDLBP | TMEM59 | PTX1 | INPP4A | TEGT | SEC11L3 | LMAN2 | IFIH1 | STCH | SELS |
| BHLHB3 | GLCC1 | WIPI49 | BTN3A3 /// | CD63 | CREB3L2 | KDELR2 | PRG1 | TLOC1 | DNAJB9 | NPC2 | C2orf30 | UBE2L6 | MGAT2 | TXNDC4 |
| C19orf10 | SPCS3 | MGC17943 | COMMD3 | PDIA4 | RPS27L | MAGED1 | PDXK | SSR3 | ZBTB38 | MAN1A1 | HIST1H2BK | C5orf18 | TRIB1 | CD164 |
| CRTPA | KIAA0746 | SEC22L1 | RPN2 | IDH2 | SNAG1 | ITM2B | GOLPH3L | SDF4 | GM2A | KRTCAP2 | TMEM19 | C22orf5 | DNCL1 | TMEM4 |
| EBAG9 | GALNT2 | LAP3 | BTG2 | TXNDC11 | GLG1 | C20orf47 | CPNE5 | RABAC1 | HEXB | DNAJB11 | UBE2J1 | SEC31L1 | H1FX | DNCL2A |
| GNG5 | UAP1 | NANS | FAM3C | KDELR1 | C11orf10 | RPN1 | NBR1 | COPB2 | SPCS2 | KIAA0152 | TMBIM4 | ARMCX3 | TMED10 | CDKN2C |
| PNOC | ALG5 | ISOC1 | APOBEC3G | QP-C | ARFGAP3 | TRAM1 | ALG2 | SERP1 | GRN | ANAPC13 | SIMP | TXNDC5 | NDUFB11 | TPD52 |
| SEC14L1 | VDP | MEF2C | APOBEC3B | GTF2A1 | DAD1 | ARMET | ACADM | FOXO3A | AKR1A1 | FLJ10980 | PSME2 | NDUFB6 | ARF4 | SRP54 |
| DC2 | FBXW7 | WDR33 | GUSB | ATP6V0E | TMED9 | SEC23B | TDE1 | GORASP2 | DDOST | | | | | |

Supplemental Figure Legends

Figure S1. LANA detection by flow cytometry on BC-3 cell line. 1.10^5 BC-3 cells were intracellularly stained with Alexa Fluor 647-conjugated anti-LANA mAb or isotype control used at a dilution of 1/50. Representative histogram showing LANA expression on BC-3 cell line stained with anti-LANA mAb (red line) or isotype control (black line).

Figure S2. Detection of LANA⁺ HHV-8-infected B cells in PBMCs from KS patients, asymptomatic carriers HHV-8+, and healthy donors. PBMCs from tree HIV seropositive untreated patients with active HHV-8 KS and without MCD, tree asymptomatic carriers seropositive for HHV-8, and tree healthy donors seronegative for HHV-8 were stained for nuclear expression of LANA and surface expression of IgM, κ and λ to identify LANA⁺ HHV-8-infected B cells. Representative flow cytometry plot of PBMCs samples from tree HIV seropositive untreated patients with active HHV-8 KS (A), tree 3 asymptomatic carriers seropositive for HHV-8 (B), and tree healthy donors seronegative for HHV-8 (C). LANA⁺ HHV-8-infected cells are analyzed for their IgM, κ and λ expression. (D). Comparison of LANA mRNA expression in the PBMCs, naïve and CD40⁻ λ^+ IgM⁺ CD38^{hi} sorted B cells from 5 patients with HHV-8 MCD.

Figure S3. Unsupervised hierarchic clustering of the 1596 genes with the highest SD among the 64 samples. Hierarchical clustering of 64 samples and a filtered 1596 genes with the highest SD. The hierarchic clustering algorithm used to generate the dendrogram is based on the average-linkage method. The matrix below the dendrogram depicts the gene expression values of the individual samples, with columns representing samples and row one gene representing individual genes ordered according to hierarchic clustering. The color scale identifies relative gene expression changes moralized by the standard deviation, with 0 representing the mean expression level of a given gene across the panel.

Figure S4. B cell subsets from patients with HHV-8 MCD and healthy donors have a similar gene expression profile. Relatedness of the gene expression profile of B cell subsets from patients with HHV-8 MCD to normal B cell subsets. Heat map illustrating the 216 significant differentially expressed genes (FDR<0.05) in B cell subsets from healthy donors (naïve, switched and marginal zone B cells). Red indicates increased expression and blue

decreased expression relative to the median expression level according to the color scale shown.

Supplemental Figures

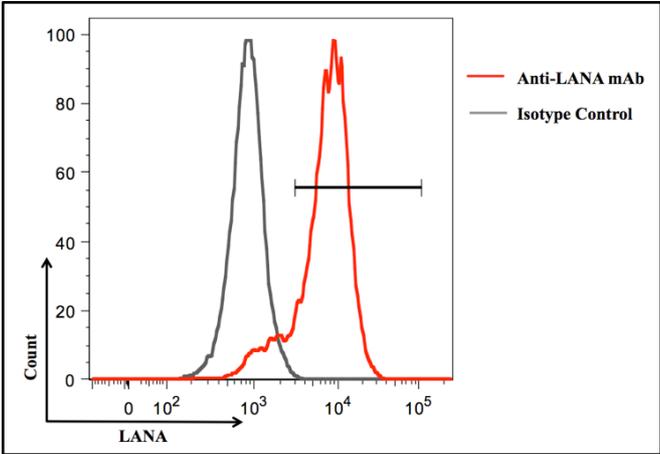


Figure S1. LANA detection by flow cytometry in BC-3 cell line.

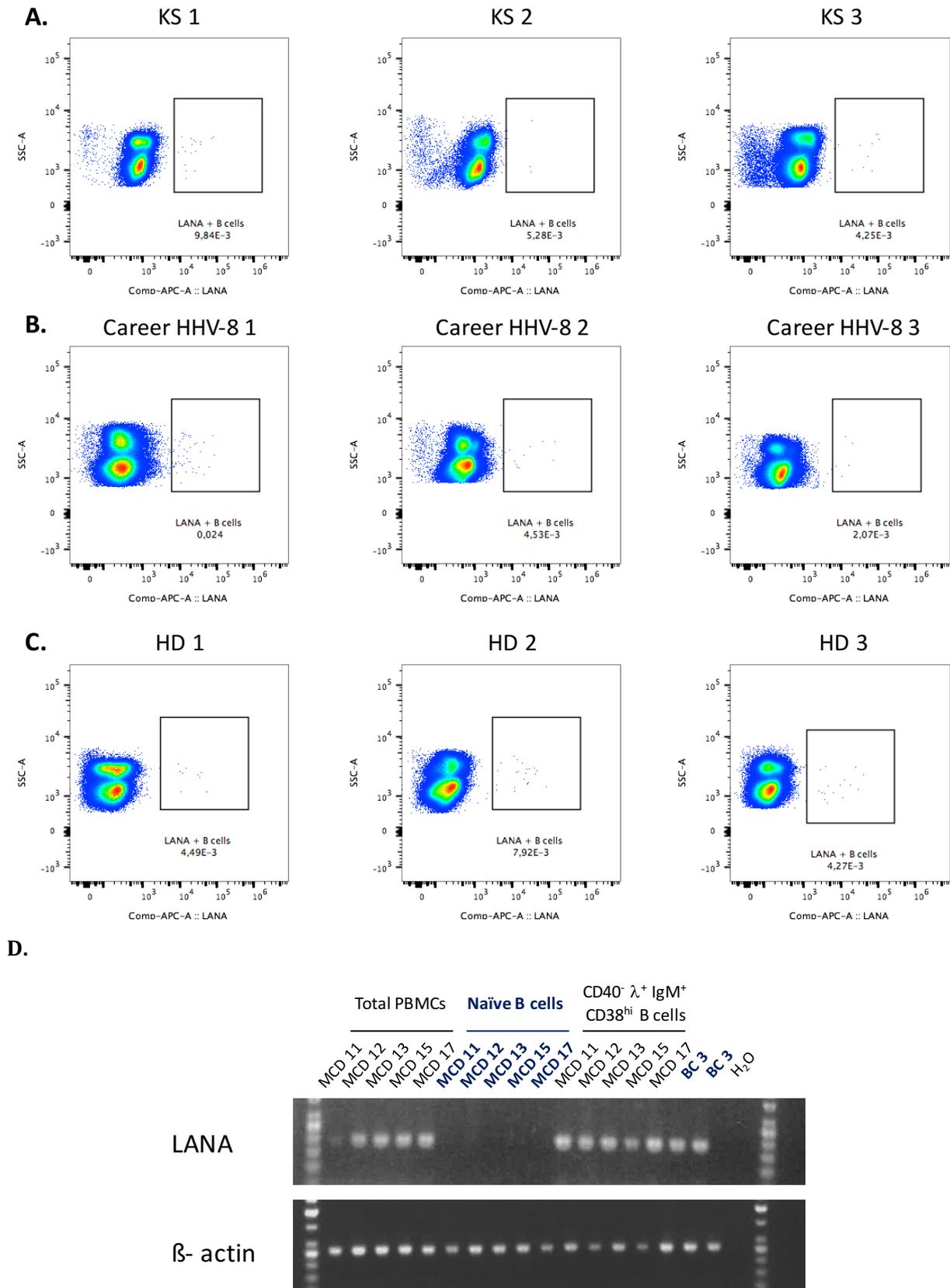


Figure S2. Detection by flow cytometry of HHV-8-infected B cells in PBMCs from 3 KS patients, 3 asymptomatic careers HHV-8+, and 3 healthy donors, and by PCR in PBMCs, naïves and CD40⁻ λ⁺ IgM⁺ CD38^{hi} sorted B cells.

CD38^{hi} B cel

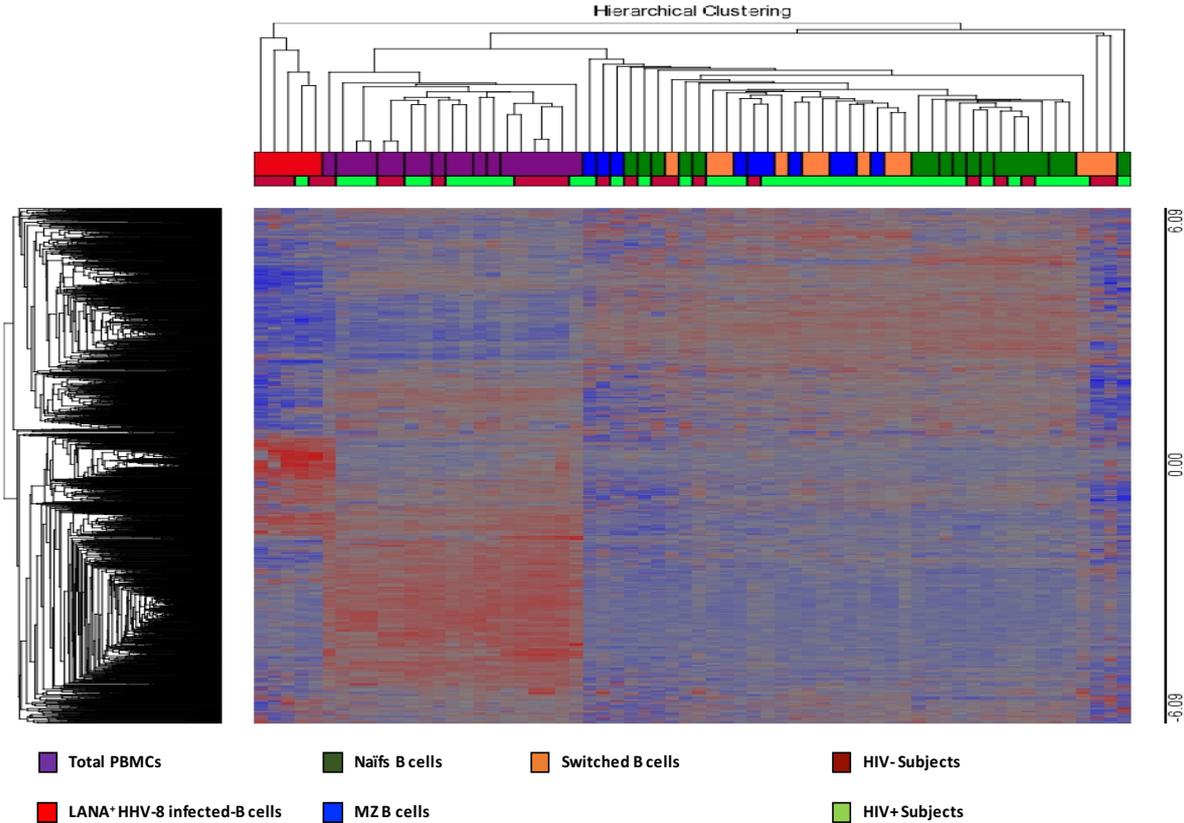


Figure S3. Unsupervised hierarchic clustering of the 1596 genes with the highest SD among the 64 samples.

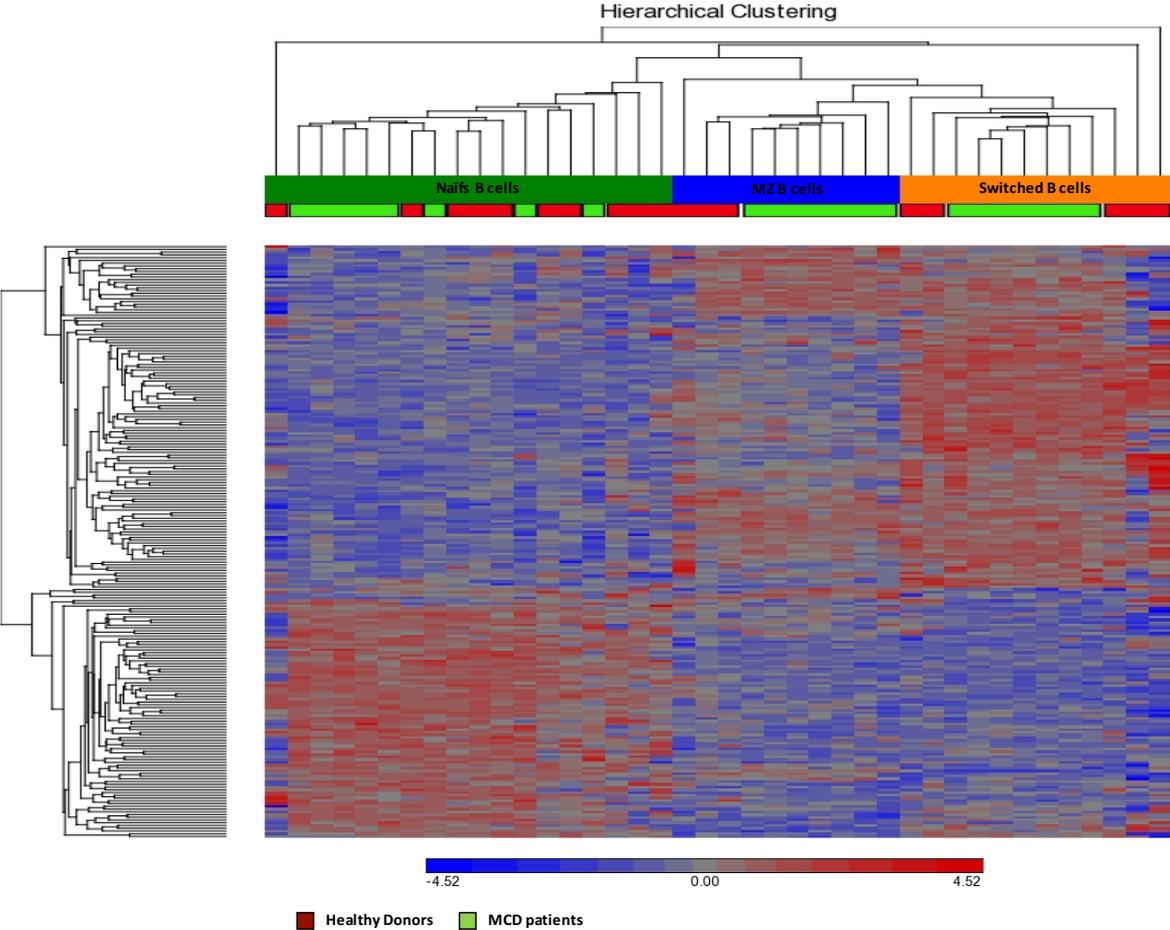


Figure S4. B cell subsets from patients with HHV-8 MCD and healthy donors have a similar gene expression profile.

III. Analyse de la région variable de la chaîne lourde de l'IgM exprimée par les lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8

La maladie de Castleman multicentrique (MCM) associée à HHV-8 est caractérisée histologiquement par une prolifération de lymphocytes B infectés par HHV-8 en différenciation plasmocytaire porteur d'un IgM restreinte à la chaîne λ . Ces lymphocytes B monotypiques présents dans les lésions de MCM seraient polyclonaux et sans mutation somatiques d'après une étude de la littérature. Nos résultats montrent que durant les poussées de MCM, une phase circulante de lymphocytes B ayant les mêmes caractéristiques phénotypiques et exprimant la protéine LANA était présente dans le sang. Nous avons aussi mis au point une stratégie de tri qui nous a permis d'isoler spécifiquement les lymphocytes B infectés par HHV-8 (stratégie de tri décrite précédemment).

Ainsi, la possibilité de trier ces cellules nous a permis d'effectuer une analyse des séquences du domaine variable V de la chaîne lourde de l'IgM de ces lymphocytes B infectés par HHV-8 et de pouvoir déterminer la nature de cette lymphoprolifération en termes de clonalité et de mutations somatiques du BCR.

Nos résultats préliminaires montrent que les lymphocytes B infectés par HHV-8 circulants sont probablement polyclonaux et ne présentent pas de mutations somatiques. Ces résultats seront rapidement complétés et inclus dans le manuscrit de la partie II des résultats.

Matériels et méthodes

Prélèvements de patients et de sujets contrôles

Les cellules mononucléées du sang périphérique (CMSP) et spléniques (CMS) des patients ayant une MCM confirmée histologiquement proviennent d'une collaboration avec l'équipe du Pr Oksenhendler (Immunologie Clinique, Hôpital Saint Louis) et ont été collectées entre 1994 et 2014. Les échantillons de rate de patients MCM résultent de splénectomies réalisées à visée diagnostique ou pour des cytopénies réfractaires. Les CMSP de sujets contrôles proviennent de l'Etablissement Français du Sang.

Congélation et décongélation des cellules mononucléées

Les CMSP sont séparées sur gradient de ficoll (Ficoll-Hypaque Eurobio), puis lavées deux fois dans du RPMI (RPMI 1640 Médium, Eurobio) et re-suspendues dans une solution contenant 10% of dimethylsulfoxid (DMSO) et 90% de serum de veau fœtal (SVF, Eurobio). Elles sont ensuite conditionnées à -80° avant conservation dans l'azote liquide. Les CMS sont isolées à partir de blocs de rate par dissociation mécanique ou enzymatique à l'aide de collagénase à 20U/ml (Sigma), DNase (Sigma) et EDTA à 10 mM dans une solution de RPMI, puis la suspension est séparée sur gradient de ficoll. Les CMS sont ensuite congelées et conditionnées comme décrit au-dessus. Les congélations ont été réalisées avant mon arrivée au laboratoire. Les échantillons sont décongelés à 37°C dans un bain marie et les cellules mononucléées sont ensuite immédiatement lavées deux fois dans du RPMI supplémenté avec 20% de SVF, puis re-suspendues dans du RPMI supplémenté avec 10% de SVF ;

Analyse en cytométrie de flux

Couplage de l'anticorps anti LANA

L'Ac monoclonal de rat anti-LANA (clone LN 53, IgG_{2c}, Advanced Biotechnologies) est couplé avec le fluorochrome Alexa Fluor 647 fluorochrome en utilisant le kit Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling (Life Technologies).

Identification et caractérisation des lymphocytes infectés par HHV- 8

Marquage membranaire

Deux millions de CMSP et les CMS sont incubées avec les Ac monoclonaux couplés à des fluorochromes : Viabilité-eFluor780 (Ebioscience) pendant 30 minutes à 4°C, puis CD20-BUV737, CD19-BUV379, CD38-PE-CF594, IgD-PE-Cy7, CD40-BV-421, CD27-BV786,

CD138-BV711, IgM-BV605 (BD Biosciences), Kappa-FITC et Lambda-PE (Dako) pendant 15 minutes à température ambiante. Puis les cellules sont lavées avec du PBS 1X (Eurobio).

Marquage intra-cytoplasmique des cellules

Après le marquage membranaire, les cellules sont lavées avec du PBS 1X/BSA et sont fixées et perméabilisées en utilisant une solution de fixation-perméabilisation (FoxP3 staining kit, eBioscience). Ensuite pour le marquage intracellulaire ces cellules sont incubées 30 minutes à température ambiante avec les Ac monoclonaux couplés à des fluorochromes : LANA-A647 et Ki67-A700 (BD Biosciences), puis lavées au PBS/BSA/EDTA, et re-suspendues dans du PBS 1X avant l'acquisition en CMF.

Acquisition et analyse en cytométrie de flux

L'analyse multiparamétrique en CMF des échantillons a été réalisée sur un cytomètre analyseur LSR Fortessa (BD Biosciences). Un minimum de 10^5 évènements a été acquis pour chaque échantillon analysé. Les données ont été analysées en utilisant les logiciels Diva 6 (BD Biosciences) pendant l'acquisition et FlowJo 9.5.2 (TreeStar) pour l'analyse secondaire.

Marquage et tri des populations lymphocytaires B et des cellules infectées par HHV-8

Les lymphocytes B sont triés sur un cytomètre trieur FACSAria (BD Biosciences) grâce aux caractéristiques phénotypiques déjà décrites par l'équipe : lymphocytes B infectés par HHV-8 (IgM^+ , lambda^+ , $\text{CD20}^{\text{low/-}}$, CD19^{low} , CD27^+ , IgD^- , $\text{CD38}^{\text{high}}$, CD40^-), lymphocytes B naïfs (CD40^+ , CD20^+ , CD19^+ , CD27^- , IgD^+), lymphocytes B switchés (CD40^+ , CD20^+ , CD19^+ , CD27^+ , IgM^- , IgD^-) et lymphocytes B de la zone marginale (CD40^+ , CD20^+ , CD19^+ , CD27^+ , IgD^{low}) sans perméabilisation permettant secondairement l'extraction d'ARN. Les Ac suivants ont été utilisés pour identifier les différentes populations : Viabilité-UV Blue (LifeTech) pendant 30min à 4°, CD19-BUV395, aCD20-Alexa700, CD40-BV421, IgM-BV605, IgD-PE-Cy7, CD27-BV786, CD38-PE-CF594 (BD Biosciences), Kappa-FITC, et Lambda-PE (Dako) pendant 15 minutes à température ambiante. Après les cellules sont lavées avec du PBS 1X puis re-suspendues dans du RPMI supplémenté avec 10% de SVF avant le tri.

Marquage intra-cytoplasmique des cellules après tri

Une petite proportion des lymphocytes B infectés sont ensuite incubés avec l'Ac monoclonal couplé au fluorochrome : LANA-A647 pendant 15-30 minutes à température ambiante puis lavées au PBS/BSA/EDTA, et re-suspendues dans du PBS 1X avant l'acquisition en CMF au cytomètre analyseur LSR Fortessa (BD Biosciences)

Extraction de l'ARN et synthèse de l'ADN complémentaire

Pour chaque échantillon, l'extraction de l'ARN est réalisée avec un kit commercial (RNAqueous, Ambion) et la quantité d'ARN extraite est mesurée au spectrophotomètre (NanoDrop 1000, Thermo Technologies). Puis l'ADN complémentaire (ADNc) est synthétisé en suivant les indications du kit commercial (Super script III) et en utilisant le programme Super script III.

Amplification par PCR des régions variables des chaînes lourdes de l'IgM

La région variable de la chaîne lourde est amplifiée en utilisant les 6 amorces des VH ext les plus fréquentes : VH1 à VH6 et une amorce C μ détaillée dans le tableau. L'amplification est réalisée selon le programme Touchdown. Une seconde PCR semi-nichée est faite en amplifiant le produit de PCR obtenue à la première PCR avec les amorces de VH int détaillés ci-dessous pour la chaîne lourde et les amorces VL int. L'amplification est réalisée avec le programme Amplitaq.

Clonage et séquençage

Les régions variables des chaînes lourdes et légères de l'IgM des lymphocytes B infectés par HHV8 des patients et des lymphocytes B naïfs des patients et des donneurs sains sont clonées et séquencées. Les produits de PCR obtenus à l'étape précédente sont purifiés en utilisant un kit commercial (GeneJET PCR Purification Kit, Thermo Scientific) puis insérés dans le vecteur pCR4-TOPO et transfectés dans des bactéries *E coli* compétentes TOP10 (TOPO TA Cloning Kit, lifeTechnologie). Les bactéries ayant intégrées le vecteur sont ensuite sélectionnées sur milieu lymphocytes B contenant de l'ampicilline et de l'X-gal. Pour chaque population cellulaire étudiée, l'ADN de 144 colonies blanches sélectionnées est purifié puis amplifié par PCR (Amorce : M13-Forward, spécifique du vecteur) et séquencé par GATC. Dans environ 80%–85% des cas, les produits de PCR sont clonés avec succès. L'analyse des séquences a été faite en utilisant les logiciels IgBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) et IMGT/V-QUEST (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanIg).

Lignée cellulaire BC3

La lignée cellulaire BC3 provient de cellules de lymphome des séreuses d'un patient non infecté par le VIH, ces cellules sont infectées par HHV-8 de manière stable mais pas par

EBV. L'antigène LANA est toujours exprimé par ces cellules (Arvanitakis et al., 1996). Après décongélation, elles sont mises en culture dans une flasque 40mL dans du RPMI complet [L-glutamine (2mM/ml, LifeTechnologie), 1% pyruvate (LifeTechnologie), 1% acides aminées non essentiels (LifeTechnologie), 1% antibiotiques (LifeTechnologie)] et 10% de SVF. Le milieu de culture est changé tous les 3-4 jours et la culture est maintenue jusqu'à 15 jours avant d'évaluer l'expression de l'antigène viral LANA par ces cellules.

Résultats

Lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 détectés au cours de la MCM sont polyclonaux

Afin d'analyser le degré de clonalité des lymphocytes B LANA⁺ triés chez les patients MCM HHV-8+, les régions variables des chaînes lourdes (VH 1 à 6) et légères de l'IgM (C μ) ont été amplifiées. Les Lymphocytes B naïfs des patients MCM HHV-8+ et sujets ont été analysés comparativement.

Après clonage et sélection des colonies bactériennes ayant intégré le plasmide, la purification et le séquençage ont été réalisées par la société GATC et nous avons analysé les séquences.

Dans un premier temps seuls les chaînes lourdes ont été séquencées et seulement pour les lymphocytes B LANA⁺ et les lymphocytes B naïfs d'un seul patient MCM HHV-8+ et un sujet contrôle.

Pour les lymphocytes B LANA⁺, les lymphocytes B naïfs du patient et du sujet contrôle 143, 143 et 87 séquences des transcrits du domaine V (VDJ) analysables sont respectivement obtenues sur 144, 144 et 96 clones séquencés. La proportion de séquences uniques est de 47% pour les lymphocytes B LANA⁺ du patient, 30 % pour les lymphocytes B naïfs du patient et 49% pour les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle. Les séquences présentes plus de 2 fois sont respectivement à 40%, 62% et 25 % pour les lymphocytes B LANA⁺ du patient, les lymphocytes B naïfs du patient et les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle. Ceci témoigne du caractère polyclonal de ces populations particulièrement pour les lymphocytes B LANA⁺.

La répartition des segments VH et JH est homogène entre les lymphocytes B LANA⁺ et les lymphocytes B naïfs du patient et proche de celle des lymphocytes B naïfs du sujet contrôle (Figure 1). Les segments VH sont tous VH1 et VH5 qui sont les VH majoritairement présents lors de l'amplification par PCR chez les sujets contrôles. VH5-51*01 est le segment plus présent constituant respectivement 35, 31 et 74 % des VH utilisés par les lymphocytes B LANA⁺ du patient, les lymphocytes B naïfs du patient et les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle. VH5-51*03 est le deuxième segment présent, retrouvé chez 31% des lymphocytes B LANA⁺ du patient et 41 % des lymphocytes B naïfs du patient mais est absent dans les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle. Vient ensuite le segment VH1-18*01 présent respectivement à 13, 18 et 10% des séquences des lymphocytes B LANA⁺, des lymphocytes B naïfs du patient et des lymphocytes B naïfs du sujet contrôle. Pour les segments JH, IGHJ4*02 est majoritaire à 60, 64 et 52% respectivement dans les séquences des lymphocytes

B LANA⁺ du patient, des lymphocytes B naïfs du patient et des lymphocytes B naïfs du sujet contrôle, suivi d'IGHJ5*02 (11, 14 et 13%) et IGHJ3*02 (10, 3 et 15%).

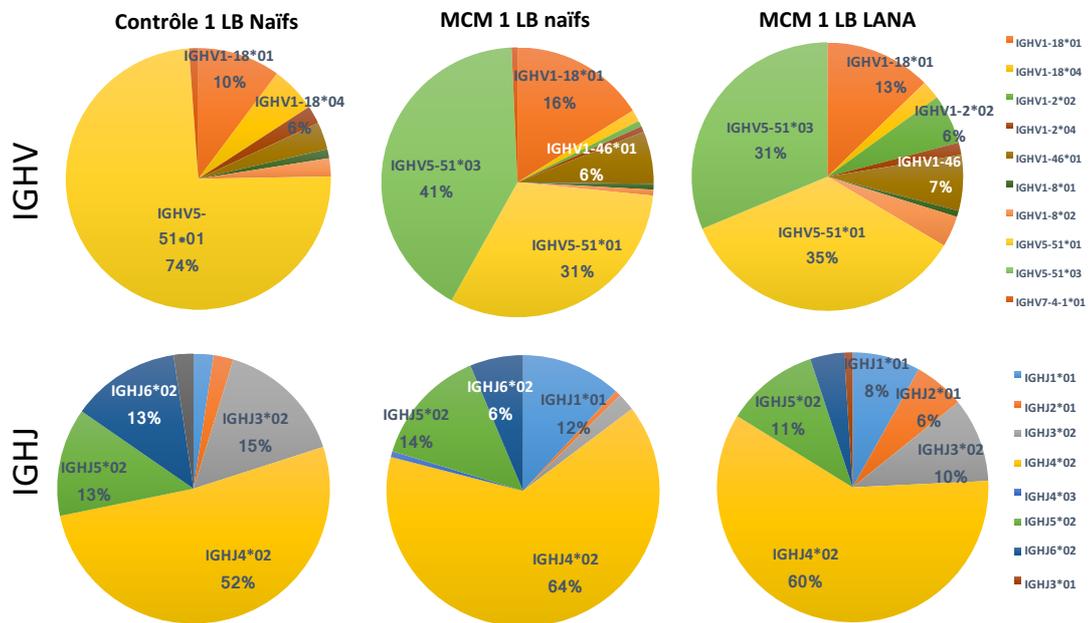


Figure 1. Analyse des séquences du domaine VH. Fréquence des différents gènes IGHV (en haut) et IGHV (en bas) utilisées par les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle (87 séquences), les lymphocytes B naïfs du patient MCM1 (143 séquences) et les lymphocytes B LANA⁺ du patient MCM1 (143 séquences). Les séquences sont analysées comparativement aux séquences germinales en utilisant IgBLAST et IMGT. Pour une meilleure lisibilité de la figure, seuls les segments IGHV et IGHJ présents dans plus de 6% des séquences sont cités

L'IgM exprimé par les lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 détectés au cours de la MCM ne présentent pas de mutations somatiques

Les séquences du domaine V (de FR1 à FR3) des VH sont comparées aux séquences germinales pour les différentes populations et le nombre de mutations a été analysé. Comme attendu, le pourcentage de séquence sans mutations est respectivement à 61 et 57 % pour les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle et du patient MCM HHV-8⁺ et la médiane est respectivement à 0 (0-21) et 0 (0-31). Les lymphocytes B LANA⁺ du patient eux aussi présentent un faible nombre de mutations (81 séquences sans mutation sur 143 soit 57 %) avec une médiane à 0 (0-74) (Figure 2).

Le ratio mutation non silencieuses sur mutations silencieuses des régions charnières (FR1, FR2 et FR3 pour framework region) rapporté aux régions hypervariables (CDR1 et CDR2 pour complementary-determining region) est à 2,42 pour les lymphocytes B LANA⁺ du

patient MCM1, 1,15 pour les lymphocytes B naïfs du patient MCM et 1,5 pour le contrôle 1 (Figure 2).

La longueur médiane du CDR3 est de 15 acides aminés pour les lymphocytes B naïfs et lymphocytes B LANA+ du patient MCM1 et similaire à celle des lymphocytes B naïfs du sujet contrôle (14 acides aminés) (Figure 2C).

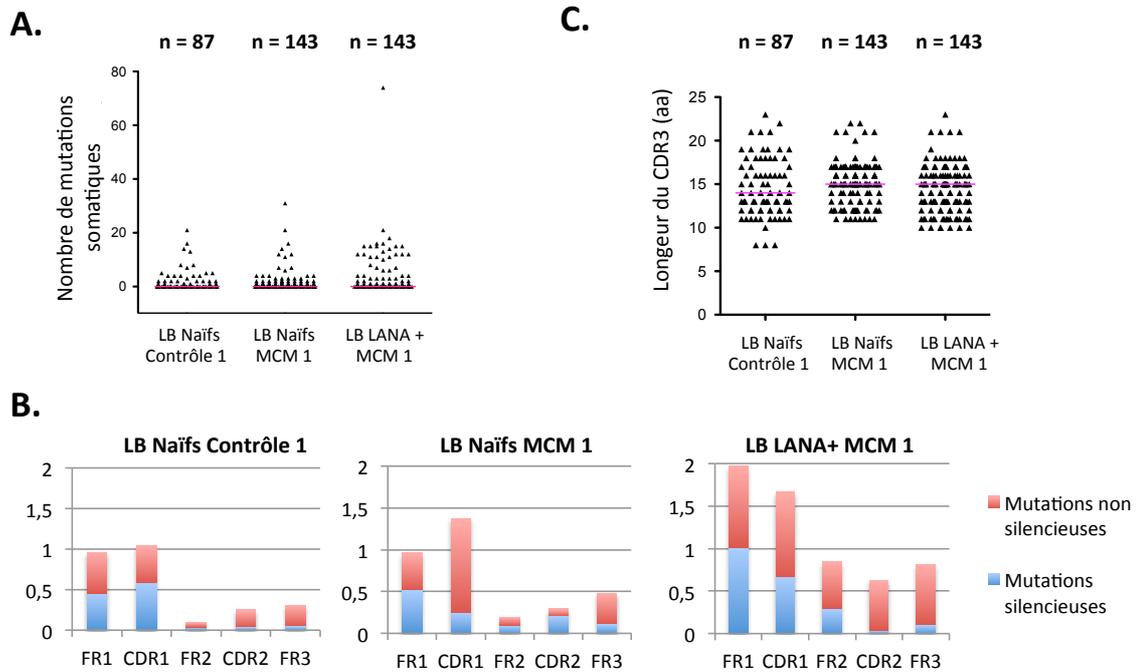


Figure 2. Analyse des séquences du domaine VH. **A.** Nombre absolu de mutations intéressant le domaine V (de FR à FR3) chez les lymphocytes B naïfs du sujet contrôle (87 séquences), les lymphocytes B naïfs du patient MCM1 (143 séquences) et les lymphocytes B LANA+ du patient MCM1 (143 séquences). **B.** Fréquence des mutations silencieuses (en bleu) et non silencieuses (en rouge) dans les régions FR1, CDR1, FR2, CDR2 et FR3 pour les 3 populations. **C.** Longueur du CD3 en acides aminés (aa) dans les trois populations. Les séquences ont été analysées en comparant à la séquence germinale en utilisant IgBLAST et IMGT.

Conclusions

Nos résultats préliminaires montrent que les lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 circulantes triés sont polyclonaux et ne présentent pas de mutations somatiques comme cela avait été décrit dans la littérature. Ces lymphocytes B infectés ne sont donc probablement pas passés par le centre germinatif malgré leur aspect de cellules différenciées plasmablastiques.

Par contre, nos résultats montrent une répartition des gènes VH de l'IgM déséquilibrée avec uniquement des VH1 et des VH5 qui sont considérés comme rares, dans les séquences analysées pour les trois types de cellules testées. Les gènes les plus représentés dans la population générale sont les VH3 et les VH4, qui représentent 75% de la population lymphocytaire B totale (Pascual et al., 1990). Ce déséquilibre pourrait être le résultat d'un biais technique, par lequel certaines amorces plus efficaces sont favorisées.

Toutefois, la question posée par notre étude est celle du caractère polyclonal des lymphocytes B infectés par HHV-8 et non du répertoire reconnu par ces mêmes lymphocytes et nos résultats permettent tout de même de répondre à cette question.

Discussion et perspectives

La Maladie de Castleman Multicentrique (MCM) peut être considérée comme le résultat d'une perte de contrôle immunitaire des cellules B infectées par HHV-8 qui prolifèrent. Des premiers travaux de l'équipe ont montrés la présence de réponses T anti-HHV-8 polyfonctionnelles mais qui restent en fréquence très faibles (Guihot et al., 2008). Ceci suggérait la présence de dérégulations plus fines des réponses immunes. Chez l'homme, des arguments récents soutiennent le rôle des cellules iNKT dans le contrôle des infections virales et en particulier dans les infections liées aux herpesvirus. Ces observations nous ont incités à analyser la fréquence et la fonction des cellules iNKT chez les patients présentant une MCM liée au virus HHV-8. Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent clairement un déficit quantitatif et un défaut de prolifération des cellules iNKT chez ces patients et suggèrent que ces cellules pourraient avoir un rôle important dans le contrôle du virus HHV-8 et participer à la physiopathologie de cette maladie.

Dans le contexte de la MCM plusieurs facteurs non directement liés à la lymphoprolifération peuvent être des facteurs responsables de ce déficit en cellules iNKT et de fait confondant. Comme les cellules iNKT représentent une très petite population dont la distribution sanguine et tissulaire est hétérogène, la faible fréquence observée dans le sang périphérique des patients MCM HHV-8+ peut être le reflet d'une redistribution tissulaire, en particulier dans la rate. L'analyse des cellules iNKT à partir de cellules mononucléées spléniques (CMS) de patients MCM HHV-8+ et de donneurs sains nous a permis de montrer que ce déficit en cellules iNKT chez les patients MCM HHV-8+ n'est pas lié à une séquestration de ces cellules dans leur rate. Le déficit n'est probablement pas non plus lié à une consommation lors des poussées de la maladie puisque l'analyse de la fréquence des cellules iNKT ne montre pas de différence entre les patients en poussée de la maladie et ceux en phase de rémission. En particulier, il est important de noter que ces rémissions étaient de plus de 6 mois (médiane 23 mois) et pouvaient aller jusqu'à 4 ans. Cependant, on ne peut pas exclure que le temps nécessaire à la reconstitution de ces cellules ne soit pas dans ce contexte pathologique plus élevé, voir que ce déficit soit non réversible comme cela semble être le cas pour les MAIT (Cosgrove et al., 2013). Dans un contexte de reconstitution immunitaire après traitement par des antirétroviraux, Yang et al. ne voient pas de réapparition de ces cellules après une année (Yang et al., 2007). Bien qu'un déficit en cellules iNKT soit décrit chez les patients infectés par le VIH, le déficit que nous rapportons chez les patients MCM HHV-8+ n'est pas lié uniquement à l'infection VIH puisqu'il est observé chez les patients MCM HHV-8+ VIH+ comme chez les patients MCM HHV-8+ VIH-. De plus, nous avons montré qu'il n'est pas

non plus lié à une réplication virale ou au déficit CD4 dans ce contexte d'infection par le virus. Enfin, nous avons montré que ce déficit n'est pas non plus lié à l'administration de rituximab ou à l'âge avancé de certains patients MCM HHV-8+.

Cependant, en analysant dans le détail les patients porteurs d'un Sarcome de Kaposi analysés comme contrôles, il est clair que certains présentent un taux d'iNKT aussi bas que les patients MCM HHV-8+. Ainsi, même si le déficit en cellules iNKT est probablement associé à l'émergence de la MCM HHV-8+, il n'est pas suffisant à lui seul pour permettre cette émergence qui reste probablement donc multifactorielle.

Nous montrons également que ce déficit quantitatif en cellules iNKT des patients MCM HHV-8+ est associé à un défaut de prolifération de ces cellules sans que cela soit lié au déficit quantitatif. Les patients MCM présentent donc un vrai défaut intrinsèque de cette population de cellules pour lequel plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

La première hypothèse que nous avons facilement testée et éliminée est celle d'une absence chez ces patients de la cytokine nécessaire à leur homéostasie périphérique qu'est l'IL15 puisque son adjonction *in vitro* ne restaure pas la capacité proliférative des cellules iNKT des patients MCM HHV-8+ qui est donc un vrai défaut constitutif. Une perte de l'expression de SAP dans les cellules T pourrait être associée au déficit et à l'absence de prolifération des cellules iNKT. La molécule SAP est une protéine cytoplasmique impliquée dans les signaux de signalisation des lymphocytes qui est également indispensable au développement des cellules iNKT comme l'en atteste le déficit en cellules iNKT chez les patients présentant un déficit immunitaire lié à l'X rare, dû à des mutations de SH2D1a qui code pour SAP (Latour, 2007). L'analyse de l'expression de la molécule SAP en intracellulaire sur les différentes sous-populations T (naïves, mémoires centrales, mémoires transitionnelles, ...) des patients présentant une MCM HHV-8+ avait été réalisée dans le laboratoire précédemment et n'a pas montré de différence significative par rapport à des sujets normaux (A Dossier, communication personnelle). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que la présentation des antigènes lipidiques par la molécule CD1d, qui est exprimée à la surface des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), participe au maintien, à l'activation et la prolifération des cellules iNKT (Bialecki et al., 2009; Bosma et al., 2012). De plus, les protéines virales MIR 1/2 qui s'expriment lors du cycle de réplication lytique de HHV- 8 induisent une régulation négative de l'expression de surface de la molécule CD1d (Sanchez et al., 2005). Nous avons donc dans un second temps postulé que l'absence de prolifération des cellules iNKT pouvait être liée à une anomalie de l'expression de la molécule CD1d sur les différentes CPA. Nous

avons analysé en CMF l'expression de cette molécule sur les différentes sous-populations de lymphocytes B (naïfs, B de la zone marginale, B mémoires switchés, IgM only), les monocytes et les cellules dendritiques dans les différents groupes de patients MCM HHV-8+ et contrôles. Nous n'observons aucune différence d'expression de la molécule CD1d (analysée en médiane d'intensité de fluorescence (MFI). Malgré la mise au point d'un marquage en cytométrie en flux des lymphocytes B LANA⁺ infectées par HHV-8 qui prolifèrent au cours des poussées de cette maladie, nous n'avons pas, du fait de la faible fréquence de ces cellules (moins de 1% des lymphocytes circulants), pu analyser leur expression de CD1d. En revanche, et de façon inattendue, cette analyse nous a permis de mettre en évidence un déficit en cellules B de la zone marginale (en périphérie et dans la rate des patients). Cette observation est importante car c'est en effet cette sous-population B qui est décrite comme exprimant le plus fortement la molécule CD1d dans la littérature (Roark et al., 1998) (et c'est d'ailleurs ce que nous observons chez nos sujets contrôles). Afin de nous assurer que ce déficit n'était pas en cause dans le déficit de prolifération des cellules iNKT, nous avons vérifié chez des donneurs sains que la déplétion en lymphocytes B n'induisait pas une absence de prolifération des cellules iNKT en culture *in vitro*.

Comme montré chez les patients XLP-2, du fait du phénotype pro-apoptotique des cellules iNKT (Gerart et al., 2013), le déficit en cellules iNKT observé chez les patients MCM HHV-8 peut être une diminution secondaire à la primo-infection par HHV-8. Malheureusement cette hypothèse ne pourra pas être testée du fait du nombre très faible des cellules iNKT détectées dans le sang périphérique et dans la rate de ces patients, actuellement disponibles dans notre cohorte. Cependant, nous pouvons tester cette hypothèse chez des patients qui développent une MCM suite à une primo-infection HHV-8. Nous pourrions ainsi évaluer le phénotype pro-apoptotique de ces cellules. La dernière hypothèse qui reste à tester quant au défaut des cellules iNKT chez les patients MCM HHV-8+ est donc celle d'une immunosénescence de ces cellules chez ces patients qui soit ont évolué de façon chronique dans l'infection VIH avant leur mise sous ARV soit sont très avancés en âge. Afin de tester la validité de cette hypothèse, nous avons déjà analysé la répartition des différentes sous-populations de cellules iNKT (CD4⁺CD8⁻, CD4⁻CD8⁺, CD4⁻CD8⁻) chez les patients MCM HHV-8+ infectés par le VIH et les patients MCM HHV-8+ âgés à la recherche de déséquilibres associés à l'immunosénescence comme décrit dans la littérature (Peralbo et al., 2007). Ceci a été comparé à la répartition des sous-populations des cellules iNKT du groupe contrôles de donneurs sains. Les résultats de l'analyse des sous-populations des cellules iNKT chez les donneurs sains et patients MCM HHV-8+ correspondent aux données décrites dans la

littérature. On observe chez les patients MCM HHV-8+ infectés par le VIH une perte des cellules iNKT CD4⁺ et chez les patients MCM HHV-8+ âgés une augmentation des cellules iNKT DN et CD4⁺ comparativement aux donneurs sains. Nous poursuivrons cette hypothèse par l'analyse par cytométrie en flux de l'expression des marqueurs de sénescence telque PD-1, LAG-3, CD57, KLRG1 par les cellules iNKT et une analyse de la longueur des télomères en RT-PCR et du dosage de l'activité de la télomérase sur des cellules iNKT triées.

Nos travaux rapportent donc un déficit important en lymphocytes B de la zone marginale et de façon générale en lymphocytes B mémoires associé au déficit en iNKT.

Des données de la littérature suggèrent que les cellules iNKT sont importantes pour la différenciation et la prolifération des lymphocytes B (King et al., 2011; Zeng et al., 2013). En particulier, Zeng and coll. montrent dans un modèle *in vitro* que les cellules iNKT induisent l'expansion de lymphocytes B mémoires non switchés CD27⁺ IgD⁺ (Zeng et al., 2013). Nous avons donc émis l'hypothèse d'un éventuel rôle des cellules iNKT dans le déséquilibre des sous-populations B observées chez les patients MCM HHV-8+. Dans un modèle *in vitro* de co-cultures dans lesquelles différents types de déplétions et adjonctions de ces 2 partenaires (lymphocytes B et cellules iNKT) de sujets sains et de patients MCM HHV-8+ sont réalisés, nous avons mis en évidence la nécessité des cellules iNKT pour le maintien des lymphocytes B mémoires CD27⁺. Nos résultats montrent que la culture de PBMCs de donneurs sains (contenant des cellules iNKT) permet l'expansion en culture courte de lymphocytes B naïfs (CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ IgD⁺) et mémoires (CD19⁺ CD20⁺ CD27⁺ IgD⁺), alors que la culture de PBMCs de patients MCM HHV-8+ (avec un déficit en cellules iNKT) ne permet que l'expansion de lymphocytes B naïfs (CD19⁺ CD20⁺ CD27⁻ IgD⁺). Puis nous avons déplété les lymphocytes B des PBMCs de donneurs sains et de patients MCM HHV-8+. Ensuite nous les avons reconstitués en lymphocytes B de manière croisée (co-culture de lymphocytes B isolés par sélection négative à l'aide de billes magnétiques de donneurs sains dans les PBMCs déplétés en lymphocytes B de patients MCM HHV-8+ et de lymphocytes B de patients MCM HHV-8+ dans les PBMCs déplétés en lymphocytes B de donneurs sains). La culture allogénique peut être utilisée pour analyser la coopération de ces deux cellules car la molécule présentatrice CD1d n'est pas polymorphique à la différence des molécules du CMH. De plus, le caractère allogénique ne gêne pas non plus ces cultures du fait de leur durée courte. Ceci a de plus été vérifié à l'aide de témoins adéquats. Nos résultats montrent que lorsque les lymphocytes B allogéniques d'un patient MCM HHV-8+ sont mis en co-culture avec les

PBMCs déplétés en lymphocytes B d'un donneur sain (contenant des cellules iNKT), on observe une prolifération des lymphocytes B CD27⁺. Mais lorsque les lymphocytes B allogéniques d'un donneur sain sont mis en co-culture avec les PBMCs déplétés en lymphocytes B d'un patient MCM HHV-8+ (c'est à dire quasiment sans cellules iNKT), on observe une absence de prolifération ou de survie des lymphocytes B CD27⁺. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse que l'absence de cellules iNKT participerait à l'absence de lymphocytes B mémoires de la zone marginale chez les patients MCM HHV-8+. Cependant, la difficulté à maintenir les lymphocytes B en culture, associé aux faibles quantités de ces cellules en particuliers chez les patients MCM ne nous ont pas permis de réussir plus de deux expériences et des tentatives supplémentaires se sont avérées vaines. Ces résultats restent donc préliminaires et demanderaient d'être vérifiés. Afin de consolider l'hypothèse du rôle des cellules iNKT sur l'homéostasie des lymphocytes B mémoires et en particulier des B MZ une confirmation *in situ* en immunohistochimie au niveau de la rate les déficits en B MZ et en cellules iNKT observés chez les patients MCM HHV-8+ (infectés par le VIH ou non) doit être effectuée. Ainsi, une analyse de la distribution spatiale de ces deux types cellulaires permettra de montrer leur interaction chez des rates saines et des rates de patients MCM HHV-8+.

Cette première partie des travaux a également ouvert d'autres perspectives. En effet, ces résultats suggèrent que le déficit en cellules iNKT induit le déséquilibre des sous-populations B observé. Le déficit en cellules iNKT pourrait induire également une perte de contrôle de la réplication du virus HHV-8 et, dans ce contexte de déséquilibre des sous-populations de B, permettrait l'émergence tumorale d'un lymphocyte B infecté par HHV8. Les cellules iNKT sont des effecteurs antiviraux qui pourraient de fait participer directement au contrôle des cellules infectées par HHV-8. L'équipe de Don Ganem, a rapporté que la réplication d'HHV-8 dans des lymphocytes B peut être contrôlée par des lymphocytes T CD4 et ce de façon non restreinte par le CMH (Myoung 2011). Ce contrôle de la réplication de HHV-8 *in vitro* n'est pas lié à un mécanisme de cytotoxicité de la cellule cible infectée. Nos résultats suggèrent que les cellules responsables du contrôle de l'infection sont les cellules iNKT dont la cytotoxicité n'est pas restreinte par le CMH et qui sont majoritairement CD4⁺. Ainsi, la poursuite de ces résultats sera donc d'analyser dans un modèle *in vitro*, le rôle des cellules iNKT dans le contrôle de la réplication du virus HHV-8 après infection de lymphocytes B par un virus recombinant HHV-8-GFP.

La cellule qui prolifère dans la MCM HHV-8+ est un lymphocyte B infecté par HHV-8 comme attesté en immunohistochimie par la présence de la protéine virale LANA et qui possède des caractéristiques morphologiques et phénotypiques particulières. Une meilleure caractérisation de cette cellule est un enjeu important quant à la compréhension de la physiopathologie de cette maladie et le développement éventuel de thérapeutiques plus ciblées.

Afin d'avoir accès directement à cette cellule nous avons dans un premier temps cherché à mettre au point un marquage intracellulaire du virus en vue de son utilisation en cytométrie de flux multiparamétrique. Pour ce faire, notre choix s'est porté sur l'antigène LANA. La protéine LANA (latency-associated nuclear antigen) est la protéine majeure de latence du virus HHV-8, elle est nécessaire à la persistance du génome viral et toujours exprimée dans toutes les cellules infectées à la fois en phase de latence et en phase lytique. L'analyse de son expression en immunohistochimie permet de faire le diagnostic de la maladie et a de fait été choisie pour identifier les lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8 en cytométrie en flux. Un anticorps monoclonal anti-LANA (clone LN53, IgG2c, Advanced Biotechnologies) a été couplé ainsi qu'un isotype contrôle à l'aide d'un kit (Life Technologies) au fluorochrome Alexa Fluor 647. Le marquage LANA a été évalué pour sa positivité sur une lignée de lymphome des séreuses HHV-8+ BC-3 et pour sa négativité sur des PBMC de sujets séronégatifs pour HHV-8. Grâce à l'analyse par cytométrie en flux de l'expression de cette protéine virale nous avons pu identifier et caractériser les lymphocytes B infectés par HHV-8 qui prolifèrent au cours de la MCM. Ainsi, pour la première fois nous montrons que ces cellules sont détectables dans le sang des patients en poussée de la maladie, et nous accédons ainsi facilement à du matériel pour les analyser extensivement. Ces cellules ont été identifiées à la fois dans les échantillons de sang et de rate de patients MCM HHV-8, et présentent les mêmes caractéristiques que les plasmablastes infectés par HHV-8 décrits dans les ganglions des patients MCM HHV8+ par immunohistochimie (Du et al. 2001). À ce jour, le diagnostic de la MCM HHV-8 se base sur des critères cliniques et histologiques, ce qui signifie qu'une biopsie des organes lymphoïdes est obligatoire pour effectuer ce diagnostic. L'identification des lymphocytes B infectés par HHV-8 dans le sang périphérique représente donc un intérêt majeur d'un point de vue clinique pour aider au diagnostic et le rendre plus rapide.

L'analyse en cytométrie en flux multiparamétrique des lymphocytes B infectés par HHV-8 nous a permis de mieux caractériser leur phénotype. En effet, leurs caractéristiques

phénotypiques ont été établies uniquement à l'aide d'analyses histologiques, une technique qui ne permet l'analyse de la coexpression que de quelques molécules à la fois. Les cellules détectées dans le sang et dans la rate de patients MCM HHV-8⁺ sont toutes monotypiques, elles n'expriment que l'IgM et la chaîne légère λ et sont CD20⁻ CD19⁻ CD27^{+/-} IgD⁻ CD38^{fort}, Ki67^{fort}, CD138. Il s'agit donc bien des mêmes cellules que les plasmablastes LANA⁺ qui prolifèrent pendant les poussées de la maladie, décrits en immunohistochimie dans les ganglions des patients MCM HHV8⁺ (Chadburn et al., 2008; Du et al., 2001; Dupin et al., 2000). Nous avons par la suite élargi notre analyse à l'expression de molécules de différenciation, de co-stimulation, de présentation antigénique ainsi qu'à l'expression de six des molécules de la famille des SLAM. Nos résultats montrent que ces lymphocytes B LANA⁺ sont de plus caractérisés par une diminution significative de l'expression de la molécule CD40. Il existe très peu de données dans la littérature sur l'expression de CD40 par les plasmablastes, mais le peu de données laissent penser qu'elle devrait être positive. Par conséquent, l'absence d'expression de CD40 à la surface des lymphocytes B infectés par HHV-8 pourrait suggérer un mécanisme d'immunomodulation viral. En effet, l'interaction CD40/CD40L est essentielle à la formation du centre germinatif avec l'acquisition de mutations somatiques et au switch isotypique pour la mise en place d'une réponse humorale spécifique. L'absence d'expression de CD40 par les lymphocytes B infectés par HHV-8 peut être mise parallèle de certaines caractéristiques de la MCM. L'atrophie des centres germinatifs est une des caractéristiques histologiques majeures de cette lymphoprolifération. De plus, bien que les cellules infectées présentent un phénotype de lymphocytes B matures, elles ne présentent pas de mutations somatiques au niveau de leur BCR (Du et al., 2001). Toutefois, cette description est limitée à un seul papier réalisé sur quelques cellules en microdissection. Enfin, l'observation selon laquelle ces cellules n'expriment que la chaîne lourde IgM de l'immunoglobuline indique qu'elles n'ont pas subi de switch isotypique. Toutes ces caractéristiques indiquent que les lymphocytes B infectés par HHV-8 ont acquis leur phénotype mature de manière T indépendante. L'absence d'expression de CD40 pourrait alors être l'un des facteurs empêchant les lymphocytes B infectés par HHV-8 d'interagir avec les lymphocytes T CD4 helper. Le phénotype mature de ces cellules pourrait être alors le résultat de la sécrétion de ν -IL6 par les cellules infectées, qui pourrait agir de manière autocrine pour induire leur différenciation terminale (Du et al., 2001). Une seconde observation nouvelle est que ces cellules B infectées par HHV-8 présentent un phénotype d'expression des molécules de la famille SLAM similaire à celui observé dans les plasmablastes (De Salort et al., 2011). Ceci conforte leur caractère plasmablastique et suggère que la perte de contrôle de ces cellules

infectées par HHV-8 qui prolifèrent n'est pas le résultat de l'acquisition d'un phénotype tumoral aberrant par ces cellules, comme observé de manière classique dans d'autres proliférations lymphocytaires.

Nous avons poursuivi la caractérisation de ces lymphocytes B infectés par HHV-8 en réalisant sur ces cellules triées en cytométrie en flux une analyse transcriptomique et une analyse de la région variable de la chaîne lourde de l'IgM exprimée par ces cellules. Les résultats ont été comparés à ceux des différentes sous-populations lymphocytaires B classiques (lymphocytes B naïfs, mémoires switchés et de la zone marginale). La première étape a donc été de mettre en place une stratégie de tri cellulaire en cytométrie en flux. En effet, la protéine virale LANA étant exprimée dans le noyau, sa détection par cytométrie en flux nécessite la perméabilisation et la fixation des cellules ce qui ne permet pas de l'utiliser pour le tri en vue d'études moléculaires secondaires. De fait, pour trier les lymphocytes B infectés par HHV-8, nous avons utilisé une stratégie de tri en se basant sur le phénotype singulier de ces cellules ($CD40^- \lambda^+ IgM^+ CD38^{high} CD19^- CD20^-$) sans avoir recours au marquage intranucléaire de la protéine virale LANA. L'expression du CD40 est discriminante puisque tous les lymphocytes B (du lymphocyte B naïf au plasmablaste/plasmocyte) expriment CD40 contrairement aux lymphocytes B LANA⁺ infectés par HHV-8. Puis, nous avons sélectionné uniquement les cellules monotypiques qui expriment la chaîne légère λ et l'IgM, avec une forte expression du CD38 et négatifs pour CD19 et CD20. L'infection de ces cellules a été vérifiée en cytométrie en flux et en PCR en analysant l'expression intranucléaire et l'expression de l'ARNm de la protéine virale LANA respectivement. De fait, cette stratégie nous a permis de trier spécifiquement les cellules infectées par HHV-8 avec un pourcentage d'expression intranucléaire de l'antigène viral LANA supérieur à 83%. Ce taux n'atteint pas 100% ce qui est probablement lié à l'efficacité du marquage et de la perméabilisation. En comparaison, la lignée BC3 (dérivée d'un patient avec un lymphome des séreuses exprimant HHV-8) qui peut servir de référence, analysée en cytométrie en flux avec notre anticorps présente un pourcentage de positivité dans les mêmes fréquences. Enfin, l'expression du transcrit LANA après amplification par PCR a également été analysée et est bien retrouvée dans les lymphocytes B $CD40^-, IgM^+, \lambda^+, CD38^{high}$ sélectionnés mais est absente des lymphocytes B naïfs. Ceci confirme que les lymphocytes B $CD40^-, IgM^+, \lambda^+, CD38^{high}$ triés par cytométrie en flux sans l'utilisation de LANA sont bien les lymphocytes B infectés par HHV-8 et exprimant la protéine virale LANA.

Nous avons ensuite effectué une analyse transcriptomique (environ 48 000 transcrits) pour établir une caractérisation plus approfondie de ces lymphocytes B infectés par HHV-8. Ainsi, l'analyse du profil d'expression des gènes de ces cellules montre un profil d'expression génique homogène et caractéristique qui distingue clairement ces cellules de toutes les autres populations lymphocytaires B. Ces cellules infectées partagent de plus les mêmes caractéristiques que les plasmablastes infectés par HHV-8 détectés dans les lésions de MCM (Blimp1⁺ IRF4⁺ Bcl6⁻ Pax5⁻) décrits par immunohistochimie validant ainsi l'identité de cette cellule et de fait les résultats de notre analyse transcriptomique (Chadburn et al., 2008).

Le profil plasmablastique de ces cellules a été confirmé en utilisant une analyse par « Gene set enrichment analysis » (GSEA). Les résultats obtenus sont cohérents avec la forte expression par tous les lymphocytes B infectés par HHV-8 des facteurs de transcription PRDM-1/Blimp-1, XBP-1 et IRF4, qui sont essentiels à la régulation de la différenciation plasmocytaire. Par ailleurs, la faible expression de marqueurs caractéristiques des lymphocytes B matures démontre de la même manière que ces cellules sont bien engagées dans la voie de différenciation plasmocytaire sous le contrôle de l'expression du facteur de transcription PRDM-1/Blimp-1. Ses résultats sont cohérents avec la faible expression de Pax-5, un facteur de transcription qui bloque la différenciation plasmocytaire en inhibant les facteurs de transcription PRDM-1/Blimp-1 et XBP-1 (Nutt et al., 1999). Au total, ces résultats démontrent que les lymphocytes B infectés par HHV-8 sont bien engagés dans la voie de différenciation plasmocytaire et que le virus HHV-8 est capable d'induire cette voie de différenciation plasmablastique dans ces lymphocytes B infectés. Cette différenciation plasmablastique observée peut être le résultat d'une activation de la voie de signalisation NFκB par la protéine virale v-FLIP qui s'exprime pendant la latence de HHV-8. Toutefois, nous n'observons pas une activation augmentée de cette voie de signalisation dans les lymphocytes B infectés par HHV-8 de la MCM. De manière contradictoire, bien que l'expression de l'IL6 soit diminuée dans les cellules infectées par HHV-8, ce virus code pour une protéine homologue à celle-ci, la v-IL6 qui peut de façon similaire que l'IL6 cellulaire, induire l'augmentation de l'expression de XBP-1 et ainsi favoriser la différenciation plasmocytaire (Jenner and Boshoff, 2002).

On observe aussi dans les lymphocytes B infectés par HHV-8 une augmentation de l'expression des gènes associés à la réponse UPR, qui est induite au court d'un stress cellulaire comme entre autre l'est la sécrétion de d'immunoglobuline par les plasmocytes. Ce processus est contrôlé par l'expression du facteur de transcription XBP-1. L'expression de XBP-1 est associée à la réactivation lytique du virus HHV-8 (Wilson et al., 2007), ce qui

suggère que cette réponse UPR peut être déclenchée soit par la production d'immunoglobulines soit par la production de nouveaux virions du virus HHV-8. Ainsi, l'expression du gène viral RTA associée à la réplication lytique doit être évaluée pour déterminer si ces cellules sont infectées de manière latente ou subissent une réplication lytique.

Enfin, nos résultats montrent que les lymphocytes B infectés par HHV-8 présentent une expression très élevée de gènes associés à un profil tumoral, tels que des gènes de prolifération cellulaire, de dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire et d'échappement au système immunitaire. En effet, HHV-8 code pour une multitude de gènes qui sont impliqués dans ces processus (Bhatt and Damania, 2012). Ainsi, dans un premier temps l'analyse GO montre que les gènes qui définissent les lymphocytes B infectés par HHV-8 identifiés par leur expression sont impliqués dans l'activation du cycle cellulaire et la prolifération. Nous avons confirmé ces observations par une analyse en cytométrie en flux qui montre une très forte expression de la molécule Ki67 par les lymphocytes B infectés par HHV-8. Cette caractéristique est d'ailleurs également associée aux cellules de PEL. Ensuite, nous montrons dans un second temps que les gènes qui sont le plus faiblement exprimés par ces lymphocytes B infectés par HHV-8 sont principalement associés à la réponse immune et à l'adhésion cellulaire. Ceci est en totale cohérence avec le fait que sur les 90 gènes du génome du virus connus, au moins 22 sont potentiellement impliqués dans l'échappement au système immunitaire. Les cellules B infectées par HHV-8 présentent une dérégulation du métabolisme énergétique avec de nombreux gènes impliqués dans la synthèse d'ATP nécessaires au métabolisme cellulaire très fortement augmentés. Les connaissances sur les altérations métaboliques induites par HHV-8 proviennent principalement d'études *in vitro* de cellules endothéliales infectées par HHV-8. Ainsi, nos résultats rapportent pour la première fois de telles altérations métaboliques, qui surviennent *in vivo* dans les lymphocytes B infectés par le virus HHV-8.

Au total, les résultats de notre analyse comparative entre les lymphocytes B infectés par HHV-8 de la MCM et les différentes sous-populations lymphocytes B confirme le phénotype très particulier et unique de cette pathologie, et permet une meilleure caractérisation de la MCM. L'ensemble de nos résultats montrent que les lymphocytes B infectés par HHV-8 sont engagés dans une prolifération aberrante tout en échappant au système immunitaire.

Un seul papier dans la littérature concernant des patients avec une MCM liée à HHV-8 décrit une polyclonalité des cellules HHV-8 positives présentes au sein des lésions tissulaires. De plus, ces cellules plasmablastiques infectées par HHV-8 ne présentent pas dans cette étude d'hypermutations somatiques (Du et al., 2001). Cette étude de 2001, réalisée à partir de microdissections de lésions de MCM et sur un nombre restreint de patients, n'a été jamais confirmée par des études ultérieures.

Nous avons donc amplifié, cloné et séquencé les régions variables des chaînes lourdes de l'IgM des lymphocytes B infectés par HHV-8 triés à partir de cellules mononucléées de patients MCM HHV-8+ et utilisé des lymphocytes B naïfs triés en parallèle comme contrôles. Les résultats préliminaires obtenus à partir des lymphocytes B infectés par HHV-8 et naïfs d'un patient et les lymphocytes B naïfs d'un sujet contrôle montrent une polyclonalité des séquences VH réalisées, confirmant que les lymphocytes B infectés par HHV-8 bien que monotypiques IgM⁺/λ⁺ sont polyclonaux. De plus, les lymphocytes B infectés par HHV-8 proviennent du sang circulant et ces résultats nous permettent donc de confirmer une nouvelle fois que ces cellules circulantes sont bien les mêmes que celles présentes dans les tissus décrits par Du et al. (Du et al. 2001) La confirmation de la polyclonalité des lymphocytes B infectés par HHV-8 sur des prélèvements supplémentaires sanguins et de la rate nous permettra d'affirmer avec les mêmes méthodes que ces cellules sont bien les mêmes dans le sang et dans les tissus/organes profonds.

Par contre, nos résultats montrent une répartition des gènes VH de l'IgM déséquilibré avec uniquement des VH1 et des VH5 qui sont considérés comme rares, dans les séquences analysées pour les trois types de cellules testées. Les gènes les plus représentés dans la population générale sont les VH3 et les VH4, qui représentent 75% de la population lymphocytaire B totale (Pascual et al., 1990). Ce déséquilibre pourrait être lié à l'absence d'efficacité de certaines des amorces utilisées. Cependant, nous avons vérifié que l'amplification par PCR des 6 VH séparément chez les lymphocytes B des sujets contrôles permettait d'obtenir tous les VH bien qu'avec des intensités de signal différentes. Cette vérification n'a pas pu être faite sur des lymphocytes B des patients faute de quantité suffisante d'ARN, mais malgré cela nous pouvons conclure que toutes les amorces VH sont fonctionnelles. Par ailleurs, l'utilisation des amorces en bulk pourrait favoriser certaines amorces plus efficaces et donc l'amplification de certains VH. Les autres possibilités qui pourraient expliquer un tel déséquilibre sont l'insertion préférentielle de certains VH dans le vecteur lors du clonage et le nombre limité de séquences qui privilégie la caractérisation des plus fréquentes. Toutefois, la question posée par notre étude est celle du caractère polyclonal

des lymphocytes B infectés par HHV-8 et non du répertoire reconnu par ces mêmes lymphocytes et nos résultats permettent tout de même de répondre à cette question. Il est clair que ces résultats seront améliorés quant à ce point dans la poursuite du travail.

Pour analyser les séquences des lymphocytes B infectés par HHV-8 nous avons choisi de les comparer à celles de lymphocytes B naïfs car les lymphocytes B de la zone marginale étaient en très faible quantité chez nos patients MCMC HHV-8+. La taille du CDR3 de ces cellules est comprise entre 8 et 23 acides aminés et est similaire entre les lymphocytes B infectés et des lymphocytes B naïfs. Nous ne retrouvons pas de mutations somatiques dans les lymphocytes B infectés par HHV-8 avec un nombre de mutations faible identique à celui des lymphocytes B naïfs pour le premier patient analysé comme cela avait déjà été décrits par Du en 2001 (Du et Al. 2001). Ces résultats préliminaires sont à confirmer sur un plus grand nombre de patients.

Au terme de ce travail, un modèle de la physiopathologie de la MCM associée à l'infection par HHV-8 peut être élaboré :

Modèle proposé de la Physiopathologie de la MCM associée à l'infection par HHV-8

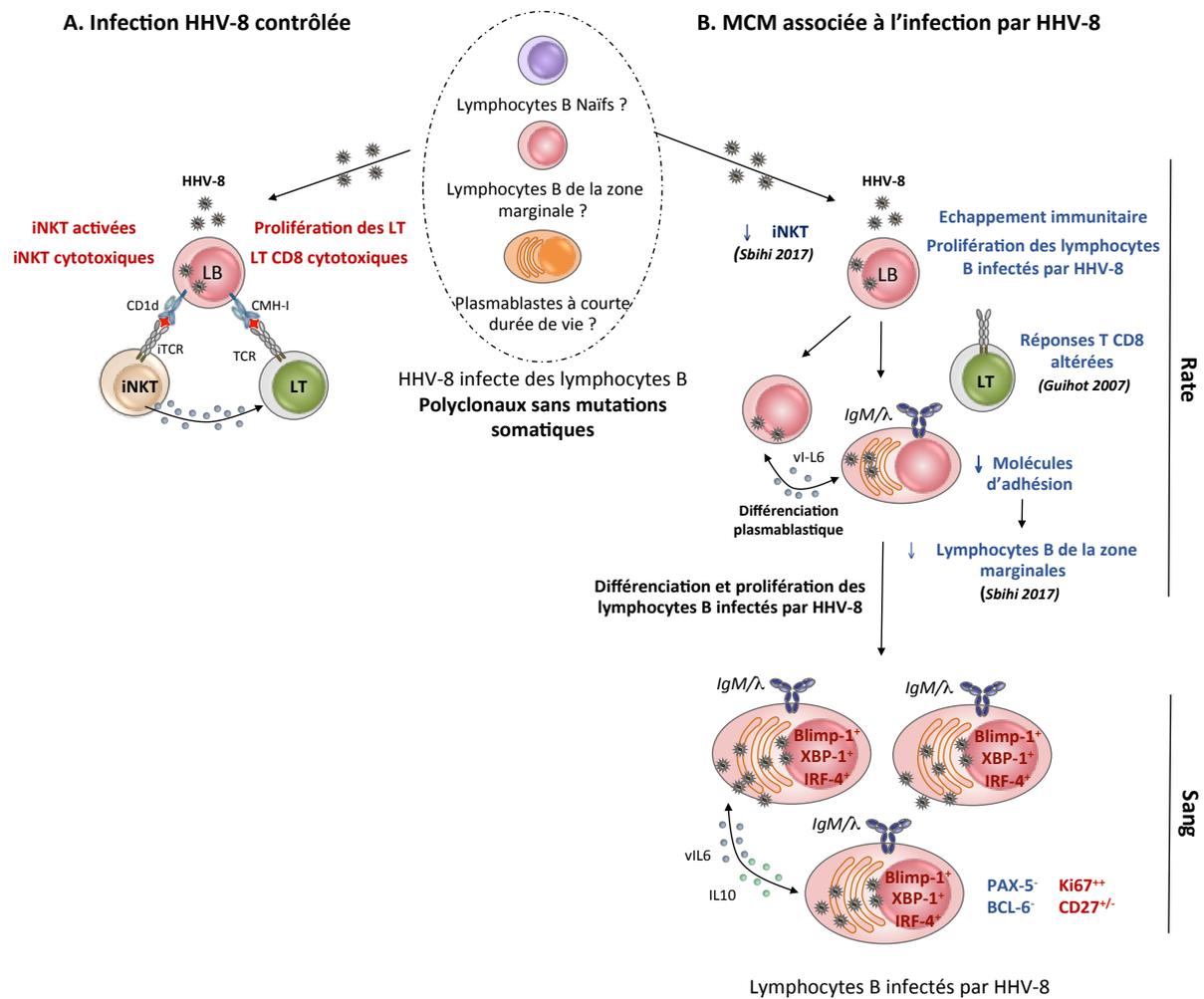


Figure 11. Modèle proposé de la physiopathologie de la MCM associée à l'infection par HHV-8.

En situation non pathologique les cellules iNKT contrôleraient, directement ou indirectement en régulant la réponse T antivirale, l'infection des lymphocytes B par HHV-8 qui serait donc associée à une réactivation lytique limitée (Figure 10A). Dans le cas pathologique de la MCM HHV-8+ une diminution significative des cellules iNKT (Sbihi et al., 2017) ainsi qu'une dérégulation des réponses T CD8 conventionnelles (Guihot et al., 2008) sont observées. Ceci conduirait à la perte de contrôle de l'infection virale par HHV-8 et à une réactivation lytique du virus et à l'émergence de lymphocytes B infectés par HHV-8 très caractéristiques de la MCM HHV-8+. Ces lymphocytes B sont paradoxalement monotypiques, IgM+ λ+ avec un phénotype plasmablastique (Chadburn et al. 2007, Sbihi en préparation). Bien que monotypiques, ils sont polyclonaux comme le suggèrent les réarrangements de leur BCR et ne

présentent pas de mutations somatiques dans les tissus lymphoïdes (Du et al., 2001) (Sbihi en préparation, cf Résultats III). Ces cellules ont une phase circulante dans le sang périphérique qui ne correspond pas à une phase leucémique (Sbihi en préparation, cf Résultats II et III). L'absence de mutations somatiques permet de supposer les lymphocytes B infectés initialement par HHV-8 proviennent d'une des trois populations de lymphocytes B naïf, BMZ ou plasmablastes à courte durée de vie. Plusieurs arguments convergent vers la possibilité que les lymphocytes B de la zone marginale soient la cible initiale de l'infection : les lymphocytes B IgM+ mémoires de l'amygdale sont les cibles préférentielles de l'infection latente persistante par HHV-8 (Hassman 2011), les lymphocytes B de la zone marginale sont les cibles spécifiques du virus MHV68 proche de HHV-8 (Frederico et al. 2014), une quasi disparition des lymphocytes B de la zone marginale est observée au cours de la MCM (Sbihi et al. 2017), ces cellules ont une forte capacité à proliférer et à sécréter rapidement des anticorps, ce qui les rend une cible potentielle pour l'infection par HHV-8. Enfin, le caractère polyclonal des cellules de la MCM HHV-8+ laisse envisager que le virus serait impliqué dans la différenciation de ces cellules en plasmablastes puisque l'analyse du profil transcriptomique des lymphocytes B infectés par HHV-8 qui partage beaucoup de similitudes quant au caractère plasmablastique avec celui observé dans l'analyse des cellules B de PEL (Sbihi en préparation, cf Résultats II et III).

Table des illustrations

| | |
|---|----|
| Figure 1. Structure 3 dimensions (3D) de la capside du virus HHV-8. (A) Cryo-microscopie électronique de la capside du virus HHV-8. (B) Reconstitution en 3D avec une résolution de 24 Å calculée à partir de 431 images. La capside est icosaédrique formée de pentamères, d'hexamères (en bleu) et de triplex (en vert). | 13 |
| Figure 2. Illustration schématique du génome du virus HHV-8, montrant l'expression des gènes viraux. Adapté de Russo et al. 1996. Les flèches indiquent la direction de la transcription. Sont représentés en vert les gènes précoces immédiats, en orange les gènes précoces, en rouge les gènes tardifs. En blanc sont indiqués les gènes qui sont exprimés à la fois pendant les phases de latence et lytique. En violet sont indiqués les gènes exprimés au cours de la phase de latence du virus. La flèche bleue indique les positions les micro-ARNs. Les gènes uniquement exprimés par le virus HHV-8 sont désignés par le préfixe K, l'absence de celui-ci indique que c'est un ORF avec des homologies cellulaires ou avec un autre virus (Russo et al., 1996)..... | 14 |
| Figure 3. Rôles de la protéine lytique K1. Activation des voies de signalisation cellulaires aboutissant à la synthèse de cytokines pro-inflammatoires ou angiogénique et à l'inhibition de l'apoptose. Les cercles oranges correspondent à une phosphorylation (Bhatt and Damania, 2012)..... | 25 |
| Figure 4. Rôles de la protéine lytique v-GPCR. Activation de voies de signalisation cellulaires aboutissant à la production de cytokines pro-inflammatoires, de facteurs de croissance/angiogéniques et à l'inhibition l'apoptose. Les cercles oranges corresponde une phosphorylation (Bhatt and Damania, 2012). | 26 |
| Figure 5. Les cellules iNKT fournissent de l'aide aux lymphocytes B par 2 mécanismes distincts. A. Les cellules iNKT fournissent de l'aide innée ou directe aux lymphocytes B. B. les cellules iNKT fournissent de l'aide adaptative ou indirecte aux lymphocytes B. | 37 |
| Figure 6. Synthèse des interactions entre les facteurs de transcriptions clefs du processus de différenciation plasmocytaire. | 42 |
| Figure 7. Illustration des trois voies métaboliques majeures : Glycolyse, synthèse et Glutaminolyse d'acide gras, et des altérations connues dans les lymphocytes B infectés par HHV-8. Une fois le glucose entré dans la cellule à travers des transporteurs tel que GLUT1, il est rapidement phosphorylé en Glc-6-phosphate, ce qui lui permet d'intégrer le cycle de la glycolyse. Le Pyruvate, le produit final de la glycolyse, est converti en lactate et il est secrété par la cellule à travers des transporteurs, tel que MCT1. Le pyruvate peut être aussi oxydé par le cycle de Krebs et générer de l'ATP. Le citrate, un intermédiaire métabolique, peut quitter le cycle de Krebs et être transporté dans le cytoplasme, ou il est transformé en acetyl-CoA qui est converti en malonyl-CoA. Acetyl- et malonyl-CoA sont combinés à l'aide d'une série de réactions par FASN, une multienzyme polypeptidique, pour former le palmitrate, qui sera élongé ou dénaturé en acide gras. Ces acides gras pourront être utilisés pour la synthèse d'autre macromolécules et de lipides nécessaires à la division cellulaire. La glutamine entre dans les cellules et rejoint le cycle de Krebs. Au cours de la latence, les | |

| | |
|---|-----|
| protéines du virus HHV-8 peuvent activer ces trois voies métaboliques (indiqué par une flèche rouge)..... | 52 |
| Figure 8 : Développement des cellules iNKT. Modèle linéaire de différenciation des cellules iNKT : le développement des cellules iNKT commence dans le thymus et peut se terminer en périphérie (chez l’Homme). On peut définir 4 stades de développement en se basant sur l’expression des marqueurs CD24, CD44 et NK1.1 (CD161 chez l’Homme). Les facteurs importants intervenant dans le développement des cellules iNKT sont indiqués en bleu. | 71 |
| Figure 9 : Modes d’activation des cellules iNKT. A. Les CPA présentent les lipides étrangers des bactéries par la molécule CD1d. La reconnaissance directe des lipides dérivés des pathogènes permet l’activation des cellules iNKT. B. Activation des cellules iNKT par des cytokines comme l’IL12 par les CPA après stimulation de leur TLR et par la présentation par CD1d de lipides du soi. C. Activation des cellules iNKT par des cytokines comme l’IL12 par les CPA après stimulation de leur TLR (Rossjohn et al., 2012). | 77 |
| Figure 10. Fonction anti-tumorale des cellules iNKT. A. les cellules iNKT peuvent reconnaître les lipides de la cellule tumorale présentés par la molécule CD1d exprimée par les cellules tumorales qu’elles éliminent par cytotoxicité directe. B. Lorsque les cellules tumorales n’expriment pas la molécule CD1d, les cellules iNKT peuvent être activées indirectement par les cellules présentatrices d’antigènes exprimant CD1d après activation par leur TLR. L’activation bidirectionnelle des cellules iNKT et des cellules dendritiques permet l’activation des cellules NK et des lymphocytes T spécifiques des antigènes tumoraux, induisant ainsi une réponse anti-tumorale indirecte. | 82 |
| Figure 11. Modèle proposé de la physiopathologie de la MCM associée à l’infection par HHV-8. | 188 |

Résumé

Le Virus Humain Herpès 8 (HHV-8) est un Herpèsvirus lymphotrope proche du virus d'Epstein Barr (EBV). Au cours de la lymphoprolifération B qu'est la Maladie de Castleman Multicentrique (MCM) HHV-8 est spécifiquement associé à une profifération de plasmablastes monotypiques IgM/ λ . Ces cellules expriment des facteurs de transcription qui suggèrent que ces cellules sont au stade plasmablastique ou pré-plasmocytaire de la différenciation B.

Les cellules invariantes Natural Killer (iNKT) sont des cellules innées qui jouent un rôle dans l'immunité antivirale, en particulier dans le contrôle des Herpèsvirus. Une diminution de ces cellules est associée à l'infection VIH ou l'âge, deux situations associées aux pathologies tumorales associées à HHV-8. Dans la première partie du travail nous avons analysés les iNKT chez des patients MCM et montrés des anomalies de fréquence et de prolifération de ces cellules. Les anomalies des cellules sont associées à des anomalies de répartition des sous populations B mémoires dans le sang circulants et la rate de ces patients. Des expériences de co-cultures montrent que les cellules iNKT pourraient être nécessaires au maintien de ces populations B.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons démontré que la MCM HHV-8 est associée pendant les poussées de a maladie à une circulation dans le sang périphérique de cellules présentant les caractéristiques typiques des plasmablastes décrits jusqu'à présent uniquement dans les tissus lymphoïdes. Nous avons ensuite analysé le profil d'expression génique des cellules B infectées par HHV-8 par rapport à celui de sous populations B normales. Nos résultats montrent clairement que les cellules infectées par HHV-8 présentent un profil d'expression génique très différent de celui des sous populations B normales. Leur profil est par ailleurs caractéristique de plasmablastes. De plus, ces cellules sont en prolifération, modulent négativement l'expression de beaucoup de gènes associés à l'immunité et l'adhésion cellulaire. Enfin, nous confirmons que les cellules B infectées par HHV-8 de la MCM sont bien polyclonales même dans le sang circulant et sans mutations somatiques.

Au total, ces résultats nous permettent de proposer un modèle de la physiopathologie de la MCM associée à l'infection HHV-8.

Mots clés: HHV-8, Maladie de Castelman Multicentrique, iNKT, lymphocytes B, échappement immun

Abstract

iNKT and B-cell alterations in HHV-8 multicentric Castleman disease

Human Herpesvirus-8 is a B-lymphotropic γ -herpesvirus closely related to the Epstein-Barr virus (EBV). He is specifically associated with monotypic (IgM/ λ) plasmablasts in Multicentric Castleman disease (HHV-8 MCD), which is a B lymphoproliferative disorder. These cells express transcription factors suggesting they are at the plasmablast or pre-plasma cell stage of differentiation.

Invariant natural killer T (iNKT) cells are innate-like T cells that play a role in antiviral immunity, specifically in controlling viral replication in EBV-infected B cells. Decline of iNKT cells is associated with age or HIV infection, both situations associated with HHV-8-related diseases. We demonstrated that iNKT cell abnormalities are associated with HHV-8 MCD. These iNKT cell alterations were found to be associated with an imbalance in the frequency of circulating and splenic B cell subsets, and results of Coculturing experiments indicate that iNKT cells may be required for maintaining this cell population.

In the second part of our work thesis, we demonstrate that HHV-8 MCD is associated with a unique population of circulating plasmablasts detected during the flare of the disease, with the typical phenotype of the MCD HHV-8-infected plasmablasts in MCD lesions. Then, we used gene expression profile analysis (about 48 000 genes) to further define the phenotype of this MCD HHV-8-infected cells and to investigate the lymphoma relationship to normal B cell subpopulations. The results showed that MCD HHV-8-infected cells displayed a common gene expression profile that is clearly distinct from all the normal B cell subpopulations. The gene expression profile of MCD HHV-8-infected cells was defined as plasmablastic. Moreover, the transcriptomic pattern of MCD HHV-8-infected cells demonstrates that these cells are proliferating and escaping the immune system. Finally, we determined the clonality and the cellular origin of the monotypic circulating plasmablasts by studying the rearranged immunoglobulin heavy genes in LANA⁺ HHV-8-infected B cells from patients with HHV-8 MCD. Our results show that these cells are polyclonal without somatic mutation. Altogether our results allowed us to elaborate a model of MCD physiopathology.

Keywords: HHV-8, Multicentric Castleman Disease, iNKT, B cells, immune evasion

Bibliographie

- Abend, J.R., Ramalingam, D., Kieffer-Kwon, P., Uldrick, T.S., Yarchoan, R., and Ziegelbauer, J.M. (2012). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNAs target IRAK1 and MYD88, two components of the toll-like receptor/interleukin-1R signaling cascade, to reduce inflammatory-cytokine expression. *J Virol* *86*, 11663-11674.
- Abend, J.R., Uldrick, T., and Ziegelbauer, J.M. (2010). Regulation of tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis receptor protein (TWEAKR) expression by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA prevents TWEAK-induced apoptosis and inflammatory cytokine expression. *J Virol* *84*, 12139-12151.
- Ahmad, A., Groshong, J.S., Matta, H., Schamus, S., Punj, V., Robinson, L.J., Gill, P.S., and Chaudhary, P.M. (2010). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral FLICE inhibitory protein (vFLIP) K13 cooperates with Myc to promote lymphoma in mice. *Cancer Biol Ther* *10*, 1033-1040.
- Ahmad, H., Gubbels, R., Ehlers, E., Meyer, F., Waterbury, T., Lin, R., and Zhang, L. (2011). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus degrades cellular Toll-interleukin-1 receptor domain-containing adaptor-inducing beta-interferon (TRIF). *J Biol Chem* *286*, 7865-7872.
- Aho, T.L., Sandholm, J., Peltola, K.J., Mankonen, H.P., Lilly, M., and Koskinen, P.J. (2004). Pim-1 kinase promotes inactivation of the pro-apoptotic Bad protein by phosphorylating it on the Ser112 gatekeeper site. *FEBS Lett* *571*, 43-49.
- Akbari, O., Stock, P., Meyer, E.H., Freeman, G.J., Sharpe, A.H., Umetsu, D.T., and DeKruyff, R.H. (2008). ICOS/ICOSL interaction is required for CD4⁺ invariant NKT cell function and homeostatic survival. *J Immunol* *180*, 5448-5456.
- Akula, S.M., Naranatt, P.P., Walia, N.S., Wang, F.Z., Fegley, B., and Chandran, B. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J Virol* *77*, 7978-7990.
- Akula, S.M., Pramod, N.P., Wang, F.Z., and Chandran, B. (2002). Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) entry into the target cells. *Cell* *108*, 407-419.
- Altieri, D.C. (2001). The molecular basis and potential role of survivin in cancer diagnosis and therapy. *Trends Mol Med* *7*, 542-547.
- Ambroziak, J.A., Blackbourn, D.J., Herndier, B.G., Glogau, R.G., Gullett, J.H., McDonald, A.R., Lennette, E.T., and Levy, J.A. (1995). Herpes-like sequences in HIV-infected and uninfected Kaposi's sarcoma patients. *Science* *268*, 582-583.
- Ansari, M.Q., Dawson, D.B., Nador, R., Rutherford, C., Schneider, N.R., Latimer, M.J., Picker, L., Knowles, D.M., and McKenna, R.W. (1996). Primary body cavity-based AIDS-related lymphomas. *Am J Clin Pathol* *105*, 221-229.
- Aoki, Y., Jaffe, E.S., Chang, Y., Jones, K., Teruya-Feldstein, J., Moore, P.S., and Tosato, G. (1999). Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6. *Blood* *93*, 4034-4043.
- Aoki, Y., Tosato, G., Fonville, T.W., and Pittaluga, S. (2001a). Serum viral interleukin-6 in AIDS-related multicentric Castleman disease. *Blood* *97*, 2526-2527.
- Aoki, Y., Yarchoan, R., Wyvill, K., Okamoto, S., Little, R.F., and Tosato, G. (2001b). Detection of viral interleukin-6 in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus-linked disorders. *Blood* *97*, 2173-2176.
- Arvanitakis, L., Mesri, E.A., Nador, R.G., Said, J.W., Asch, A.S., Knowles, D.M., and Cesarman, E. (1996). Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* *88*, 2648-2654.
- Avery, D.T., Bryant, V.L., Ma, C.S., de Waal Malefyt, R., and Tangye, S.G. (2008). IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J Immunol* *181*, 1767-1779.

- Avery, D.T., Kalled, S.L., Ellyard, J.I., Ambrose, C., Bixler, S.A., Thien, M., Brink, R., Mackay, F., Hodgkin, P.D., and Tangye, S.G. (2003). BAFF selectively enhances the survival of plasmablasts generated from human memory B cells. *J Clin Invest* *112*, 286-297.
- Babcock, G.J., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, A.D. (2000). The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* *13*, 497-506.
- Baev, D.V., Peng, X.H., Song, L., Barnhart, J.R., Crooks, G.M., Weinberg, K.I., and Metelitsa, L.S. (2004). Distinct homeostatic requirements of CD4⁺ and CD4⁻ subsets of Valpha24-invariant natural killer T cells in humans. *Blood* *104*, 4150-4156.
- Bain, G., Maandag, E.C., Izon, D.J., Amsen, D., Kruisbeek, A.M., Weintraub, B.C., Krop, I., Schlissel, M.S., Feeney, A.J., van Roon, M., *et al.* (1994). E2A proteins are required for proper B cell development and initiation of immunoglobulin gene rearrangements. *Cell* *79*, 885-892.
- Bais, C., Santomasso, B., Coso, O., Arvanitakis, L., Raaka, E.G., Gutkind, J.S., Asch, A.S., Cesarman, E., Gershengorn, M.C., and Mesri, E.A. (1998). G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* *391*, 86-89.
- Bais, C., Van Geelen, A., Eroles, P., Mutlu, A., Chiozzini, C., Dias, S., Silverstein, R.L., Raffii, S., and Mesri, E.A. (2003). Kaposi's sarcoma associated herpesvirus G protein-coupled receptor immortalizes human endothelial cells by activation of the VEGF receptor-2/ KDR. *Cancer Cell* *3*, 131-143.
- Bajaj, B.G., Verma, S.C., Lan, K., Cotter, M.A., Woodman, Z.L., and Robertson, E.S. (2006). KSHV encoded LANA upregulates Pim-1 and is a substrate for its kinase activity. *Virology* *351*, 18-28.
- Balazs, M., Martin, F., Zhou, T., and Kearney, J. (2002). Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses. *Immunity* *17*, 341-352.
- Ballestas, M.E., Chatis, P.A., and Kaye, K.M. (1999). Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* *284*, 641-644.
- Ballon, G., Chen, K., Perez, R., Tam, W., and Cesarman, E. (2011). Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV) vFLIP oncoprotein induces B cell transdifferentiation and tumorigenesis in mice. *J Clin Invest* *121*, 1141-1153.
- Banovic, T., Yanilla, M., Simmons, R., Robertson, I., Schroder, W.A., Raffelt, N.C., Wilson, Y.A., Hill, G.R., Hogan, P., and Nourse, C.B. (2011). Disseminated varicella infection caused by varicella vaccine strain in a child with low invariant natural killer T cells and diminished CD1d expression. *J Infect Dis* *204*, 1893-1901.
- Barbera, A.J., Ballestas, M.E., and Kaye, K.M. (2004). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency-associated nuclear antigen 1 N terminus is essential for chromosome association, DNA replication, and episome persistence. *J Virol* *78*, 294-301.
- Barbera, A.J., Chodaparambil, J.V., Kelley-Clarke, B., Luger, K., and Kaye, K.M. (2006). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA hitches a ride on the chromosome. *Cell Cycle* *5*, 1048-1052.
- Barozzi, P., Bonini, C., Potenza, L., Masetti, M., Cappelli, G., Gruarin, P., Whitby, D., Gerunda, G.E., Mondino, A., Riva, G., *et al.* (2008). Changes in the immune responses against human herpesvirus-8 in the disease course of posttransplant Kaposi sarcoma. *Transplantation* *86*, 738-744.
- Barral, P., Eckl-Dorna, J., Harwood, N.E., De Santo, C., Salio, M., Illarionov, P., Besra, G.S., Cerundolo, V., and Batista, F.D. (2008). B cell receptor-mediated uptake of CD1d-restricted antigen augments antibody responses by recruiting invariant NKT cell help in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8345-8350.
- Basso, K., and Dalla-Favera, R. (2012). Roles of BCL6 in normal and transformed germinal center B cells. *Immunol Rev* *247*, 172-183.
- Bechtel, J.T., Winant, R.C., and Ganem, D. (2005). Host and viral proteins in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* *79*, 4952-4964.
- Belanger, C., Gravel, A., Tomoiu, A., Janelle, M.E., Gosselin, J., Tremblay, M.J., and Flamand, L. (2001). Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *J Hum Virol* *4*, 62-73.
- Bellare, P., and Ganem, D. (2009). Regulation of KSHV lytic switch protein expression by a virus-encoded microRNA: an evolutionary adaptation that fine-tunes lytic reactivation. *Cell Host Microbe* *6*, 570-575.
- Bendelac, A., Lantz, O., Quimby, M.E., Yewdell, J.W., Bennink, J.R., and Brutkiewicz, R.R. (1995). CD1 recognition by mouse NK1⁺ T lymphocytes. *Science* *268*, 863-865.

- Bendelac, A., Savage, P.B., and Teyton, L. (2007). The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 25, 297-336.
- Benlagha, K., Kyin, T., Beavis, A., Teyton, L., and Bendelac, A. (2002). A thymic precursor to the NK T cell lineage. *Science* 296, 553-555.
- Benlagha, K., Wei, D.G., Veiga, J., Teyton, L., and Bendelac, A. (2005). Characterization of the early stages of thymic NKT cell development. *J Exp Med* 202, 485-492.
- Bhatt, A.P., and Damania, B. (2012). AKTivation of PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by KSHV. *Front Immunol* 3, 401.
- Bhatt, A.P., Jacobs, S.R., Freemerman, A.J., Makowski, L., Rathmell, J.C., Dittmer, D.P., and Damania, B. (2012). Dysregulation of fatty acid synthesis and glycolysis in non-Hodgkin lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11818-11823.
- Bialecki, E., Paget, C., Fontaine, J., Capron, M., Trottein, F., and Faveeuw, C. (2009). Role of marginal zone B lymphocytes in invariant NKT cell activation. *J Immunol* 182, 6105-6113.
- Bihl, F., Mosam, A., Henry, L.N., Chisholm, J.V., 3rd, Dollard, S., Gumbi, P., Cassol, E., Page, T., Mueller, N., Kiepiela, P., *et al.* (2007a). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific immune reconstitution and antiviral effect of combined HAART/chemotherapy in HIV clade C-infected individuals with Kaposi's sarcoma. *AIDS* 21, 1245-1252.
- Bihl, F., Narayan, M., Chisholm, J.V., 3rd, Henry, L.M., Suscovich, T.J., Brown, E.E., Welzel, T.M., Kaufmann, D.E., Zaman, T.M., Dollard, S., *et al.* (2007b). Lytic and latent antigens of the human gammaherpesviruses Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and Epstein-Barr virus induce T-cell responses with similar functional properties and memory phenotypes. *J Virol* 81, 4904-4908.
- Blasig, C., Zietz, C., Haar, B., Neipel, F., Esser, S., Brockmeyer, N.H., Tschachler, E., Colombini, S., Ensoli, B., and Sturzl, M. (1997). Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J Virol* 71, 7963-7968.
- Boshoff, C., and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2, 373-382.
- Boshoff, C., and Weiss, R.A. (2001). Epidemiology and pathogenesis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 517-534.
- Bosma, A., Abdel-Gadir, A., Isenberg, D.A., Jury, E.C., and Mauri, C. (2012). Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity* 36, 477-490.
- Boss, I.W., Nadeau, P.E., Abbott, J.R., Yang, Y., Mergia, A., and Renne, R. (2011). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded ortholog of microRNA miR-155 induces human splenic B-cell expansion in NOD/LtSz-scid IL2Rgammanull mice. *J Virol* 85, 9877-9886.
- Bourboulia, D., Aldam, D., Lagos, D., Allen, E., Williams, I., Cornforth, D., Copas, A., and Boshoff, C. (2004). Short- and long-term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune responses and viraemia. *AIDS* 18, 485-493.
- Brennan, P.J., Brigl, M., and Brenner, M.B. (2013). Invariant natural killer T cells: an innate activation scheme linked to diverse effector functions. *Nat Rev Immunol* 13, 101-117.
- Brigl, M., and Brenner, M.B. (2004). CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol* 22, 817-890.
- Brigl, M., Bry, L., Kent, S.C., Gumperz, J.E., and Brenner, M.B. (2003). Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat Immunol* 4, 1230-1237.
- Brinkmann, M.M., Glenn, M., Rainbow, L., Kieser, A., Henke-Gendo, C., and Schulz, T.F. (2003). Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein. *J Virol* 77, 9346-9358.
- Brinkmann, M.M., Pietrek, M., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., and Schulz, T.F. (2007). Modulation of host gene expression by the K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 81, 42-58.
- Brinkmann, M.M., and Schulz, T.F. (2006). Regulation of intracellular signalling by the terminal membrane proteins of members of the Gammaherpesvirinae. *J Gen Virol* 87, 1047-1074.
- Brodin, P., Jovic, V., Gao, T., Bhattacharya, S., Angel, C.J., Furman, D., Shen-Orr, S., Dekker, C.L., Swan, G.E., Butte, A.J., *et al.* (2015). Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell* 160, 37-47.

- Brousset, P., Cesarman, E., Meggetto, F., Lamant, L., and Delsol, G. (2001). Colocalization of the viral interleukin-6 with latent nuclear antigen-1 of human herpesvirus-8 in endothelial spindle cells of Kaposi's sarcoma and lymphoid cells of multicentric Castleman's disease. *Hum Pathol* 32, 95-100.
- Bubman, D., Guasparri, I., and Cesarman, E. (2007). Deregulation of c-Myc in primary effusion lymphoma by Kaposi's sarcoma herpesvirus latency-associated nuclear antigen. *Oncogene* 26, 4979-4986.
- Cai, X., Lu, S., Zhang, Z., Gonzalez, C.M., Damania, B., and Cullen, B.R. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 5570-5575.
- Caldwell, R.G., Wilson, J.B., Anderson, S.J., and Longnecker, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Callan, M.F., Steven, N., Krausa, P., Wilson, J.D., Moss, P.A., Gillespie, G.M., Bell, J.I., Rickinson, A.B., and McMichael, A.J. (1996). Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med* 2, 906-911.
- Carbone, A., Gloghini, A., Cabras, A., and Elia, G. (2009). The Germinal centre-derived lymphomas seen through their cellular microenvironment. *Br J Haematol* 145, 468-480.
- Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., *et al.* (2005). Perisinusoidal B cells in the bone marrow participate in T-independent responses to blood-borne microbes. *Immunity* 23, 397-407.
- Cassese, G., Arce, S., Hauser, A.E., Lehnert, K., Moewes, B., Mostarac, M., Muehlinghaus, G., Szyska, M., Radbruch, A., and Manz, R.A. (2003). Plasma cell survival is mediated by synergistic effects of cytokines and adhesion-dependent signals. *J Immunol* 171, 1684-1690.
- Castleman, B., and Towne, V.W. (1954). Case records of the Massachusetts General Hospital; weekly clinicopathological exercises; founded by Richard C. Cabot. *N Engl J Med* 251, 396-400.
- Cattani, P., Capuano, M., Cerimele, F., La Parola, I.L., Santangelo, R., Masini, C., Cerimele, D., and Fadda, G. (1999). Human herpesvirus 8 seroprevalence and evaluation of nonsexual transmission routes by detection of DNA in clinical specimens from human immunodeficiency virus-seronegative patients from central and southern Italy, with and without Kaposi's sarcoma. *J Clin Microbiol* 37, 1150-1153.
- Cattelan, A.M., Calabro, M.L., Aversa, S.M., Zanchetta, M., Meneghetti, F., De Rossi, A., and Chieco-Bianchi, L. (1999). Regression of AIDS-related Kaposi's sarcoma following antiretroviral therapy with protease inhibitors: biological correlates of clinical outcome. *Eur J Cancer* 35, 1809-1815.
- Cesarman, E. (2011). Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett* 305, 163-174.
- Cesarman, E., Chang, Y., Moore, P.S., Said, J.W., and Knowles, D.M. (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 332, 1186-1191.
- Cesarman, E., and Knowles, D.M. (1999). The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in lymphoproliferative diseases. *Semin Cancer Biol* 9, 165-174.
- Cesarman, E., Nador, R.G., Bai, F., Bohenzky, R.A., Russo, J.J., Moore, P.S., Chang, Y., and Knowles, D.M. (1996). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma. *J Virol* 70, 8218-8223.
- Chadburn, A., Hyjek, E.M., Tam, W., Liu, Y., Rengifo, T., Cesarman, E., and Knowles, D.M. (2008). Immunophenotypic analysis of the Kaposi sarcoma herpesvirus (KSHV; HHV-8)-infected B cells in HIV+ multicentric Castleman disease (MCD). *Histopathology* 53, 513-524.
- Chang, J., Renne, R., Dittmer, D., and Ganem, D. (2000). Inflammatory cytokines and the reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication. *Virology* 266, 17-25.
- Chang, P.C., and Li, M. (2008). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K-cyclin interacts with Cdk9 and stimulates Cdk9-mediated phosphorylation of p53 tumor suppressor. *J Virol* 82, 278-290.
- Chang, P.P., Barral, P., Fitch, J., Pratama, A., Ma, C.S., Kallies, A., Hogan, J.J., Cerundolo, V., Tangye, S.G., Bittman, R., *et al.* (2011). Identification of Bcl-6-dependent follicular helper NKT cells that provide cognate help for B cell responses. *Nat Immunol* 13, 35-43.

- Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M., and Moore, P.S. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266, 1865-1869.
- Chang, Y., Moore, P.S., Talbot, S.J., Boshoff, C.H., Zarkowska, T., Godden, K., Paterson, H., Weiss, R.A., and Mittnacht, S. (1996). Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* 382, 410.
- Chatterjee, M., Osborne, J., Bestetti, G., Chang, Y., and Moore, P.S. (2002). Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science* 298, 1432-1435.
- Chaudhary, P.M., Jasmin, A., Eby, M.T., and Hood, L. (1999). Modulation of the NF-kappa B pathway by virally encoded death effector domains-containing proteins. *Oncogene* 18, 5738-5746.
- Cho, N.H., Choi, Y.K., and Choi, J.K. (2008). Multi-transmembrane protein K15 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets Lyn kinase in the membrane raft and induces NFAT/AP1 activities. *Exp Mol Med* 40, 565-573.
- Chow, D., He, X., Snow, A.L., Rose-John, S., and Garcia, K.C. (2001). Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science* 291, 2150-2155.
- Chugh, P., Matta, H., Schamus, S., Zachariah, S., Kumar, A., Richardson, J.A., Smith, A.L., and Chaudhary, P.M. (2005). Constitutive NF-kappaB activation, normal Fas-induced apoptosis, and increased incidence of lymphoma in human herpes virus 8 K13 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 12885-12890.
- Chun, T., Page, M.J., Gapin, L., Matsuda, J.L., Xu, H., Nguyen, H., Kang, H.S., Stanic, A.K., Joyce, S., Koltun, W.A., *et al.* (2003). CD1d-expressing dendritic cells but not thymic epithelial cells can mediate negative selection of NKT cells. *J Exp Med* 197, 907-918.
- Chung, B.K., Tsai, K., Allan, L.L., Zheng, D.J., Nie, J.C., Biggs, C.M., Hasan, M.R., Kozak, F.K., van den Elzen, P., Priatel, J.J., *et al.* (2013). Innate immune control of EBV-infected B cells by invariant natural killer T cells. *Blood* 122, 2600-2608.
- Chung, Y., Nurieva, R., Esashi, E., Wang, Y.H., Zhou, D., Gapin, L., and Dong, C. (2008). A critical role of costimulation during intrathymic development of invariant NK T cells. *J Immunol* 180, 2276-2283.
- Cimmino, L., Martins, G.A., Liao, J., Magnusdottir, E., Grunig, G., Perez, R.K., and Calame, K.L. (2008). Blimp-1 attenuates Th1 differentiation by repression of ifng, tbx21, and bcl6 gene expression. *J Immunol* 181, 2338-2347.
- Cinamon, G., Zachariah, M.A., Lam, O.M., Foss, F.W., Jr., and Cyster, J.G. (2008). Follicular shuttling of marginal zone B cells facilitates antigen transport. *Nat Immunol* 9, 54-62.
- Cohen, N.R., Garg, S., and Brenner, M.B. (2009). Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Adv Immunol* 102, 1-94.
- Coscoy, L., and Ganem, D. (2001). A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J Clin Invest* 107, 1599-1606.
- Cosgrove, C., Ussher, J.E., Rauch, A., Gartner, K., Kurioka, A., Huhn, M.H., Adelman, K., Kang, Y.H., Fergusson, J.R., Simmonds, P., *et al.* (2013). Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺/MAIT cells in HIV infection. *Blood* 121, 951-961.
- Covens, K., Verbinnen, B., Geukens, N., Meyts, I., Schuit, F., Van Lommel, L., Jacquemin, M., and Bossuyt, X. (2013). Characterization of proposed human B-1 cells reveals pre-plasmablast phenotype. *Blood* 121, 5176-5183.
- Crotty, S. (2011). Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu Rev Immunol* 29, 621-663.
- Crowe, N.Y., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med* 196, 119-127.
- Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Taura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M. (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* 278, 1623-1626.
- D'Cruz, L.M., Yang, C.Y., and Goldrath, A.W. (2010). Transcriptional regulation of NKT cell development and homeostasis. *Curr Opin Immunol* 22, 199-205.
- Dairaghi, D.J., Fan, R.A., McMaster, B.E., Hanley, M.R., and Schall, T.J. (1999). HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. Agonist and antagonist profiles of viral chemokines. *J Biol Chem* 274, 21569-21574.

- Dalloul, A., Oksenhendler, E., Chosidow, O., Ribaud, P., Carcelain, G., Louvet, S., Massip, P., Lebon, P., and Autran, B. (2004). Severe herpes virus (HSV-2) infection in two patients with myelodysplasia and undetectable NK cells and plasmacytoid dendritic cells in the blood. *J Clin Virol* 30, 329-336.
- Davis, D.A., Rinderknecht, A.S., Zoetewij, J.P., Aoki, Y., Read-Connole, E.L., Tosato, G., Blauvelt, A., and Yarchoan, R. (2001). Hypoxia induces lytic replication of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 97, 3244-3250.
- de Franca, T.R., de Araujo, R.A., Ribeiro, C.M., and Leao, J.C. (2011). Salivary shedding of HHV-8 in people infected or not by human immunodeficiency virus 1. *J Oral Pathol Med* 40, 97-102.
- de Sanjose, S., Mbisa, G., Perez-Alvarez, S., Benavente, Y., Sukvirach, S., Hieu, N.T., Shin, H.R., Anh, P.T., Thomas, J., Lazcano, E., *et al.* (2009). Geographic variation in the prevalence of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus and risk factors for transmission. *J Infect Dis* 199, 1449-1456.
- Delgado, T., Carroll, P.A., Punjabi, A.S., Margineantu, D., Hockenbery, D.M., and Lagunoff, M. (2010). Induction of the Warburg effect by Kaposi's sarcoma herpesvirus is required for the maintenance of latently infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10696-10701.
- Delgado, T., Sanchez, E.L., Camarda, R., and Lagunoff, M. (2012). Global metabolic profiling of infection by an oncogenic virus: KSHV induces and requires lipogenesis for survival of latent infection. *PLoS Pathog* 8, e1002866.
- Dellabona, P., Abrignani, S., and Casorati, G. (2014). iNKT-cell help to B cells: a cooperative job between innate and adaptive immune responses. *Eur J Immunol* 44, 2230-2237.
- Derudder, E., Cadera, E.J., Vahl, J.C., Wang, J., Fox, C.J., Zha, S., van Loo, G., Pasparakis, M., Schlissel, M.S., Schmidt-Supprian, M., *et al.* (2009). Development of immunoglobulin lambda-chain-positive B cells, but not editing of immunoglobulin kappa-chain, depends on NF-kappaB signals. *Nat Immunol* 10, 647-654.
- Detre, C., Keszei, M., Garrido-Mesa, N., Kis-Toth, K., Castro, W., Agyemang, A.F., Veerapen, N., Besra, G.S., Carroll, M.C., Tsokos, G.C., *et al.* (2012). SAP expression in invariant NKT cells is required for cognate help to support B-cell responses. *Blood* 120, 122-129.
- Diana, J., and Lehuen, A. (2009). NKT cells: friend or foe during viral infections? *Eur J Immunol* 39, 3283-3291.
- Djerbi, M., Screpanti, V., Catrina, A.I., Bogen, B., Biberfeld, P., and Grandien, A. (1999). The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors. *J Exp Med* 190, 1025-1032.
- Doisne, J.M., Bartholin, L., Yan, K.P., Garcia, C.N., Duarte, N., Le Luduec, J.B., Vincent, D., Cyprian, F., Horvat, B., Martel, S., *et al.* (2009). iNKT cell development is orchestrated by different branches of TGF-beta signaling. *J Exp Med* 206, 1365-1378.
- Doisne, J.M., Soulard, V., Becourt, C., Amniai, L., Henrot, P., Havenar-Daughton, C., Blanchet, C., Zitvogel, L., Ryffel, B., Cavaillon, J.M., *et al.* (2011). Cutting edge: crucial role of IL-1 and IL-23 in the innate IL-17 response of peripheral lymph node NK1.1- invariant NKT cells to bacteria. *J Immunol* 186, 662-666.
- Dossier, A., Meignin, V., Fieschi, C., Boutboul, D., Oksenhendler, E., and Galicier, L. (2013). Human herpesvirus 8-related Castleman disease in the absence of HIV infection. *Clin Infect Dis* 56, 833-842.
- Du, M.Q., Liu, H., Diss, T.C., Ye, H., Hamoudi, R.A., Dupin, N., Meignin, V., Oksenhendler, E., Boshoff, C., and Isaacson, P.G. (2001). Kaposi sarcoma-associated herpesvirus infects monotypic (IgM lambda) but polyclonal naive B cells in Castleman disease and associated lymphoproliferative disorders. *Blood* 97, 2130-2136.
- Dupin, N., Diss, T.L., Kellam, P., Tulliez, M., Du, M.Q., Sicard, D., Weiss, R.A., Isaacson, P.G., and Boshoff, C. (2000). HHV-8 is associated with a plasmablastic variant of Castleman disease that is linked to HHV-8-positive plasmablastic lymphoma. *Blood* 95, 1406-1412.
- Dupin, N., Fisher, C., Kellam, P., Ariad, S., Tulliez, M., Franck, N., van Marck, E., Salmon, D., Gorin, I., Escande, J.P., *et al.* (1999). Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 4546-4551.
- Dupre, L., Andolfi, G., Tangye, S.G., Clementi, R., Locatelli, F., Arico, M., Aiuti, A., and Roncarolo, M.G. (2005). SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells. *Blood* 105, 4383-4389.

- Dupuy, S., Lambert, M., Zucman, D., Choukem, S.P., Tognarelli, S., Pages, C., Lebbe, C., and Caillat-Zucman, S. (2012). Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma. *PLoS Pathog* 8, e1002486.
- Eberl, G., Lowin-Kropf, B., and MacDonald, H.R. (1999). Cutting edge: NKT cell development is selectively impaired in Fyn- deficient mice. *J Immunol* 163, 4091-4094.
- Ellis, M., Chew, Y.P., Fallis, L., Freddersdorf, S., Boshoff, C., Weiss, R.A., Lu, X., and Mitnacht, S. (1999). Degradation of p27(Kip) cdk inhibitor triggered by Kaposi's sarcoma virus cyclin-cdk6 complex. *EMBO J* 18, 644-653.
- Eltom, M.A., Jemal, A., Mbulaiteye, S.M., Devesa, S.S., and Biggar, R.J. (2002). Trends in Kaposi's sarcoma and non-Hodgkin's lymphoma incidence in the United States from 1973 through 1998. *J Natl Cancer Inst* 94, 1204-1210.
- Endres, M.J., Garlisi, C.G., Xiao, H., Shan, L., and Hedrick, J.A. (1999). The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KSHV)-encoded chemokine vMIP-I is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR)8. *J Exp Med* 189, 1993-1998.
- Ettinger, R., Sims, G.P., Fairhurst, A.M., Robbins, R., da Silva, Y.S., Spolski, R., Leonard, W.J., and Lipsky, P.E. (2005). IL-21 induces differentiation of human naive and memory B cells into antibody-secreting plasma cells. *J Immunol* 175, 7867-7879.
- Fakhari, F.D., Jeong, J.H., Kanan, Y., and Dittmer, D.P. (2006). The latency-associated nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus induces B cell hyperplasia and lymphoma. *J Clin Invest* 116, 735-742.
- Forestier, C., Park, S.H., Wei, D., Benlagha, K., Teyton, L., and Bendelac, A. (2003). T cell development in mice expressing CD1d directed by a classical MHC class II promoter. *J Immunol* 171, 4096-4104.
- Foster-Cuevas, M., Wright, G.J., Puklavec, M.J., Brown, M.H., and Barclay, A.N. (2004). Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J Virol* 78, 7667-7676.
- Frances, C., Marcelin, A.G., Legendre, C., Chevret, S., Dussaix, E., Lejeune, J., Euvrard, S., Bigorie, A., Schulz, T.F., Agbalika, F., *et al.* (2009). The impact of preexisting or acquired Kaposi sarcoma herpesvirus infection in kidney transplant recipients on morbidity and survival. *Am J Transplant* 9, 2580-2586.
- Friborg, J., Jr., Kong, W., Hottiger, M.O., and Nabel, G.J. (1999). p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402, 889-894.
- Fulcher, D.A., Avery, D.T., Fewings, N.L., Berglund, L.J., Wong, S., Riminton, D.S., Adelstein, S., and Tangye, S.G. (2009). Invariant natural killer (iNK) T cell deficiency in patients with common variable immunodeficiency. *Clin Exp Immunol* 157, 365-369.
- Fuxa, M., and Busslinger, M. (2007). Reporter gene insertions reveal a strictly B lymphoid-specific expression pattern of Pax5 in support of its B cell identity function. *J Immunol* 178, 3031-3037.
- Gack, M.U., Shin, Y.C., Joo, C.H., Urano, T., Liang, C., Sun, L., Takeuchi, O., Akira, S., Chen, Z., Inoue, S., *et al.* (2007). TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. *Nature* 446, 916-920.
- Gaidano, G., Capello, D., Cilia, A.M., Gloghini, A., Perin, T., Quattrone, S., Migliazza, A., Lo Coco, F., Saglio, G., Ascoli, V., *et al.* (1999a). Genetic characterization of HHV-8/KSHV-positive primary effusion lymphoma reveals frequent mutations of BCL6: implications for disease pathogenesis and histogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 24, 16-23.
- Gaidano, G., Capello, D., Gloghini, A., Fassone, L., Vivenza, D., Ariatti, C., Migliazza, A., Saglio, G., and Carbone, A. (1999b). Frequent mutation of bcl-6 proto-oncogene in high grade, but not low grade, MALT lymphomas of the gastrointestinal tract. *Haematologica* 84, 582-588.
- Gaidano, G., and Dalla-Favera, R. (1993). Biologic and molecular characterization of non-Hodgkin's lymphoma. *Curr Opin Oncol* 5, 776-784.
- Gaidano, G., Gloghini, A., Gattei, V., Rossi, M.F., Cilia, A.M., Godeas, C., Degan, M., Perin, T., Canzonieri, V., Aldinucci, D., *et al.* (1997). Association of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-positive primary effusion lymphoma with expression of the CD138/syndecan-1 antigen. *Blood* 90, 4894-4900.

- Galli, G., Nuti, S., Tavarini, S., Galli-Stampino, L., De Lalla, C., Casorati, G., Dellabona, P., and Abrignani, S. (2003). CD1d-restricted help to B cells by human invariant natural killer T lymphocytes. *J Exp Med* *197*, 1051-1057.
- Ganem, D. (2010). KSHV and the pathogenesis of Kaposi sarcoma: listening to human biology and medicine. *J Clin Invest* *120*, 939-949.
- Garrigues, H.J., Rubinchikova, Y.E., Dipersio, C.M., and Rose, T.M. (2008). Integrin alphaVbeta3 Binds to the RGD motif of glycoprotein B of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and functions as an RGD-dependent entry receptor. *J Virol* *82*, 1570-1580.
- Gerart, S., Siberil, S., Martin, E., Lenoir, C., Aguilar, C., Picard, C., Lantz, O., Fischer, A., and Latour, S. (2013). Human iNKT and MAIT cells exhibit a PLZF-dependent proapoptotic propensity that is counterbalanced by XIAP. *Blood* *121*, 614-623.
- Gessain, A., Sudaka, A., Briere, J., Fouchar, N., Nicola, M.A., Rio, B., Arborio, M., Troussard, X., Audouin, J., Diebold, J., *et al.* (1996). Kaposi sarcoma-associated herpes-like virus (human herpesvirus type 8) DNA sequences in multicentric Castleman's disease: is there any relevant association in non-human immunodeficiency virus-infected patients? *Blood* *87*, 414-416.
- Girard, L., Hanna, Z., Beaulieu, N., Hoemann, C.D., Simard, C., Kozak, C.A., and Jolicoeur, P. (1996). Frequent provirus insertional mutagenesis of Notch1 in thymomas of MMTVD/myc transgenic mice suggests a collaboration of c-myc and Notch1 for oncogenesis. *Genes Dev* *10*, 1930-1944.
- Godden-Kent, D., Talbot, S.J., Boshoff, C., Chang, Y., Moore, P., Weiss, R.A., and Mitnacht, S. (1997). The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1. *J Virol* *71*, 4193-4198.
- Godfrey, D.I., Stankovic, S., and Baxter, A.G. (2010). Raising the NKT cell family. *Nat Immunol* *11*, 197-206.
- Gottwein, E., and Cullen, B.R. (2010). A human herpesvirus microRNA inhibits p21 expression and attenuates p21-mediated cell cycle arrest. *J Virol* *84*, 5229-5237.
- Gottwein, E., Mukherjee, N., Sachse, C., Frenzel, C., Majoros, W.H., Chi, J.T., Braich, R., Manoharan, M., Soutschek, J., Ohler, U., *et al.* (2007). A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155. *Nature* *450*, 1096-1099.
- Goubier, A., Vocanson, M., Macari, C., Poyet, G., Herbelin, A., Nicolas, J.F., Dubois, B., and Kaiserlian, D. (2013). Invariant NKT cells suppress CD8(+) T-cell-mediated allergic contact dermatitis independently of regulatory CD4(+) T cells. *J Invest Dermatol* *133*, 980-987.
- Grawunder, U., Leu, T.M., Schatz, D.G., Werner, A., Rolink, A.G., Melchers, F., and Winkler, T.H. (1995). Down-regulation of RAG1 and RAG2 gene expression in preB cells after functional immunoglobulin heavy chain rearrangement. *Immunity* *3*, 601-608.
- Gregory, S.M., and Damania, B. (2009). KSHV and the toll of innate immune activation. *Cell Cycle* *8*, 3246-3247.
- Gregory, S.M., Davis, B.K., West, J.A., Taxman, D.J., Matsuzawa, S., Reed, J.C., Ting, J.P., and Damania, B. (2011). Discovery of a viral NLR homolog that inhibits the inflammasome. *Science* *331*, 330-334.
- Gregory, S.M., Wang, L., West, J.A., Dittmer, D.P., and Damania, B. (2012). Latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of monocytes downregulates expression of adaptive immune response costimulatory receptors and proinflammatory cytokines. *J Virol* *86*, 3916-3923.
- Gregory, S.M., West, J.A., Dillon, P.J., Hilscher, C., Dittmer, D.P., and Damania, B. (2009). Toll-like receptor signaling controls reactivation of KSHV from latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 11725-11730.
- Griewank, K., Borowski, C., Rietdijk, S., Wang, N., Julien, A., Wei, D.G., Mamchak, A.A., Terhorst, C., and Bendelac, A. (2007). Homotypic interactions mediated by Slamf1 and Slamf6 receptors control NKT cell lineage development. *Immunity* *27*, 751-762.
- Grubor-Bauk, B., Arthur, J.L., and Mayrhofer, G. (2008). Importance of NKT cells in resistance to herpes simplex virus, fate of virus-infected neurons, and level of latency in mice. *J Virol* *82*, 11073-11083.
- Grubor-Bauk, B., Simmons, A., Mayrhofer, G., and Speck, P.G. (2003). Impaired clearance of herpes simplex virus type 1 from mice lacking CD1d or NKT cells expressing the semivariant V alpha 14-J alpha 281 TCR. *J Immunol* *170*, 1430-1434.

- Guihot, A., Dupin, N., Marcelin, A.G., Gorin, I., Bedin, A.S., Bossi, P., Galicier, L., Oksenhendler, E., Autran, B., and Carcelain, G. (2006). Low T cell responses to human herpesvirus 8 in patients with AIDS-related and classic Kaposi sarcoma. *J Infect Dis* *194*, 1078-1088.
- Guihot, A., Oksenhendler, E., Galicier, L., Marcelin, A.G., Papagno, L., Bedin, A.S., Agbalika, F., Dupin, N., Cadranel, J., Autran, B., *et al.* (2008). Multicentric Castleman disease is associated with polyfunctional effector memory HHV-8-specific CD8⁺ T cells. *Blood* *111*, 1387-1395.
- Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J., and Ravetch, J.V. (2000). Absence of marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nat Immunol* *1*, 31-36.
- Guo, H.G., Browning, P., Nicholas, J., Hayward, G.S., Tschachler, E., Jiang, Y.W., Sadowska, M., Raffeld, M., Colombini, S., Gallo, R.C., *et al.* (1997). Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma. *Virology* *228*, 371-378.
- Guo, J., Hawwari, A., Li, H., Sun, Z., Mahanta, S.K., Littman, D.R., Krangel, M.S., and He, Y.W. (2002). Regulation of the TCR α repertoire by the survival window of CD4(+)CD8(+) thymocytes. *Nat Immunol* *3*, 469-476.
- Gutierrez, N.C., Ocio, E.M., de Las Rivas, J., Maiso, P., Delgado, M., Ferminan, E., Arcos, M.J., Sanchez, M.L., Hernandez, J.M., and San Miguel, J.F. (2007). Gene expression profiling of B lymphocytes and plasma cells from Waldenstrom's macroglobulinemia: comparison with expression patterns of the same cell counterparts from chronic lymphocytic leukemia, multiple myeloma and normal individuals. *Leukemia* *21*, 541-549.
- Hage, C.A., Kohli, L.L., Cho, S., Brutkiewicz, R.R., Twigg, H.L., 3rd, and Knox, K.S. (2005). Human immunodeficiency virus gp120 downregulates CD1d cell surface expression. *Immunol Lett* *98*, 131-135.
- Hagman, J., and Lukin, K. (2006). Transcription factors drive B cell development. *Curr Opin Immunol* *18*, 127-134.
- Hassman, L.M., Ellison, T.J., and Kedes, D.H. (2011). KSHV infects a subset of human tonsillar B cells, driving proliferation and plasmablast differentiation. *J Clin Invest* *121*, 752-768.
- Hideshima, T., Chauhan, D., Teoh, G., Raje, N., Treon, S.P., Tai, Y.T., Shima, Y., and Anderson, K.C. (2000). Characterization of signaling cascades triggered by human interleukin-6 versus Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-encoded viral interleukin 6. *Clin Cancer Res* *6*, 1180-1189.
- Hix, L.M., Shi, Y.H., Brutkiewicz, R.R., Stein, P.L., Wang, C.R., and Zhang, M. (2011). CD1d-expressing breast cancer cells modulate NKT cell-mediated antitumor immunity in a murine model of breast cancer metastasis. *PLoS One* *6*, e20702.
- Hladik, W., Dollard, S.C., Mermin, J., Fowlkes, A.L., Downing, R., Amin, M.M., Banage, F., Nzaro, E., Kataaha, P., Dondero, T.J., *et al.* (2006). Transmission of human herpesvirus 8 by blood transfusion. *N Engl J Med* *355*, 1331-1338.
- Honjo, T., Kinoshita, K., and Muramatsu, M. (2002). Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation. *Annu Rev Immunol* *20*, 165-196.
- Horst, D., Geerdink, R.J., Gram, A.M., Stoppelenburg, A.J., and Rensing, M.E. (2012). Hiding lipid presentation: viral interference with CD1d-restricted invariant natural killer T (iNKT) cell activation. *Viruses* *4*, 2379-2399.
- Hu, D., Wang, V., Yang, M., Abdullah, S., Davis, D.A., Uldrick, T.S., Polizzotto, M.N., Veeranna, R.P., Pittaluga, S., Tosato, G., *et al.* (2015). Induction of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Viral Interleukin-6 by X-Box Binding Protein 1. *J Virol* *90*, 368-378.
- Inn, K.S., Lee, S.H., Rathbun, J.Y., Wong, L.Y., Toth, Z., Machida, K., Ou, J.H., and Jung, J.U. (2011). Inhibition of RIG-I-mediated signaling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded deubiquitinase ORF64. *J Virol* *85*, 10899-10904.
- Inoue, N., Winter, J., Lal, R.B., Offermann, M.K., and Koyano, S. (2003). Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an Rta-dependent reporter cell line. *J Virol* *77*, 8147-8152.
- Ishido, S., Wang, C., Lee, B.S., Cohen, G.B., and Jung, J.U. (2000). Downregulation of major histocompatibility complex class I molecules by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5 proteins. *J Virol* *74*, 5300-5309.
- Jacobs, S.R., and Damania, B. (2011). The viral interferon regulatory factors of KSHV: immunosuppressors or oncogenes? *Front Immunol* *2*, 19.

- Jacobs, S.R., Gregory, S.M., West, J.A., Wollish, A.C., Bennett, C.L., Blackburn, D.J., Heise, M.T., and Damania, B. (2013). The viral interferon regulatory factors of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus differ in their inhibition of interferon activation mediated by toll-like receptor 3. *J Virol* 87, 798-806.
- Jayawardena-Wolf, J., and Bendelac, A. (2001). CD1 and lipid antigens: intracellular pathways for antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 13, 109-113.
- Jego, G., Palucka, A.K., Blanck, J.P., Chalouni, C., Pascual, V., and Banchereau, J. (2003). Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 19, 225-234.
- Jenner, R.G., Alba, M.M., Boshoff, C., and Kellam, P. (2001). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J Virol* 75, 891-902.
- Jenner, R.G., and Boshoff, C. (2002). The molecular pathology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim Biophys Acta* 1602, 1-22.
- Jenner, R.G., Maillard, K., Cattini, N., Weiss, R.A., Boshoff, C., Wooster, R., and Kellam, P. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected primary effusion lymphoma has a plasma cell gene expression profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 10399-10404.
- Jha, H.C., Sun, Z., Upadhyay, S.K., El-Naccache, D.W., Singh, R.K., Sahu, S.K., and Robertson, E.S. (2016). KSHV-Mediated Regulation of Par3 and SNAIL Contributes to B-Cell Proliferation. *PLoS Pathog* 12, e1005801.
- Jones, K.D., Aoki, Y., Chang, Y., Moore, P.S., Yarchoan, R., and Tosato, G. (1999). Involvement of interleukin-10 (IL-10) and viral IL-6 in the spontaneous growth of Kaposi's sarcoma herpesvirus-associated infected primary effusion lymphoma cells. *Blood* 94, 2871-2879.
- Jourdan, M., Caraux, A., De Vos, J., Fiol, G., Larroque, M., Cognot, C., Bret, C., Duperray, C., Hose, D., and Klein, B. (2009). An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. *Blood* 114, 5173-5181.
- Katano, H., Sato, Y., Kurata, T., Mori, S., and Sata, T. (2000). Expression and localization of human herpesvirus 8-encoded proteins in primary effusion lymphoma, Kaposi's sarcoma, and multicentric Castlemans disease. *Virology* 269, 335-344.
- Kawai, T., Takahashi, K., Sato, S., Coban, C., Kumar, H., Kato, H., Ishii, K.J., Takeuchi, O., and Akira, S. (2005). IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. *Nat Immunol* 6, 981-988.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Motoki, K., Ueno, H., Nakagawa, R., Sato, H., Kondo, E., *et al.* (1997). CD1d-restricted and TCR-mediated activation of Valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* 278, 1626-1629.
- Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., *et al.* (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 5690-5693.
- Keller, S.A., Hernandez-Hopkins, D., Vider, J., Ponomarev, V., Hyjek, E., Schattner, E.J., and Cesarman, E. (2006). NF-kappaB is essential for the progression of KSHV- and EBV-infected lymphomas in vivo. *Blood* 107, 3295-3302.
- Kerur, N., Veettil, M.V., Sharma-Walia, N., Bottero, V., Sadagopan, S., Otageri, P., and Chandran, B. (2011). IFI16 acts as a nuclear pathogen sensor to induce the inflammasome in response to Kaposi Sarcoma-associated herpesvirus infection. *Cell Host Microbe* 9, 363-375.
- Kilger, E., Kieser, A., Baumann, M., and Hammerschmidt, W. (1998). Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *EMBO J* 17, 1700-1709.
- King, I.L., Fortier, A., Tighe, M., Dibble, J., Watts, G.F., Veerapen, N., Haberman, A.M., Besra, G.S., Mohrs, M., Brenner, M.B., *et al.* (2011). Invariant natural killer T cells direct B cell responses to cognate lipid antigen in an IL-21-dependent manner. *Nat Immunol* 13, 44-50.
- Klein, U., Gloghini, A., Gaidano, G., Chadburn, A., Cesarman, E., Dalla-Favera, R., and Carbone, A. (2003). Gene expression profile analysis of AIDS-related primary effusion lymphoma (PEL) suggests a plasmablastic derivation and identifies PEL-specific transcripts. *Blood* 101, 4115-4121.
- Kliche, S., Nagel, W., Kremmer, E., Atzler, C., Ege, A., Knorr, T., Koszinowski, U., Kolanus, W., and Haas, J. (2001). Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Mol Cell* 7, 833-843.

- Knodel, M., Kuss, A.W., Berberich, I., and Schimpl, A. (2001). Blimp-1 over-expression abrogates IL-4- and CD40-mediated suppression of terminal B cell differentiation but arrests isotype switching. *Eur J Immunol* *31*, 1972-1980.
- Kometani, K., Nakagawa, R., Shinnakasu, R., Kaji, T., Rybouchkin, A., Moriyama, S., Furukawa, K., Koseki, H., Takemori, T., and Kurosaki, T. (2013). Repression of the transcription factor Bach2 contributes to predisposition of IgG1 memory B cells toward plasma cell differentiation. *Immunity* *39*, 136-147.
- Kroenke, M.A., Eto, D., Locci, M., Cho, M., Davidson, T., Haddad, E.K., and Crotty, S. (2012). Bcl6 and Maf cooperate to instruct human follicular helper CD4 T cell differentiation. *J Immunol* *188*, 3734-3744.
- Kuppers, R. (2003). B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* *3*, 801-812.
- Kurosaki, T., Kometani, K., and Ise, W. (2015). Memory B cells. *Nat Rev Immunol* *15*, 149-159.
- Lagos, D., Trotter, M.W., Vart, R.J., Wang, H.W., Matthews, N.C., Hansen, A., Flore, O., Gotch, F., and Boshoff, C. (2007). Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded vFLIP and vIRF1 regulate antigen presentation in lymphatic endothelial cells. *Blood* *109*, 1550-1558.
- Lagos, D., Vart, R.J., Gratrix, F., Westrop, S.J., Emuss, V., Wong, P.P., Robey, R., Imami, N., Bower, M., Gotch, F., *et al.* (2008). Toll-like receptor 4 mediates innate immunity to Kaposi sarcoma herpesvirus. *Cell Host Microbe* *4*, 470-483.
- Laichalk, L.L., and Thorley-Lawson, D.A. (2005). Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* *79*, 1296-1307.
- Lambert, M., Gannage, M., Karras, A., Abel, M., Legendre, C., Kerob, D., Agbalika, F., Girard, P.M., Lebbe, C., and Caillat-Zucman, S. (2006). Differences in the frequency and function of HHV8-specific CD8 T cells between asymptomatic HHV8 infection and Kaposi sarcoma. *Blood* *108*, 3871-3880.
- Lan, K., Choudhuri, T., Murakami, M., Kuppers, D.A., and Robertson, E.S. (2006). Intracellular activated Notch1 is critical for proliferation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-associated B-lymphoma cell lines in vitro. *J Virol* *80*, 6411-6419.
- Lan, K., Kuppers, D.A., and Robertson, E.S. (2005). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation is regulated by interaction of latency-associated nuclear antigen with recombination signal sequence-binding protein Jkappa, the major downstream effector of the Notch signaling pathway. *J Virol* *79*, 3468-3478.
- Latour, S. (2007). Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* *7*, 510-514.
- Lazarevic, V., Zullo, A.J., Schweitzer, M.N., Staton, T.L., Gallo, E.M., Crabtree, G.R., and Glimcher, L.H. (2009). The gene encoding early growth response 2, a target of the transcription factor NFAT, is required for the development and maturation of natural killer T cells. *Nat Immunol* *10*, 306-313.
- Leadbetter, E.A., Brigl, M., Illarionov, P., Cohen, N., Luteran, M.C., Pillai, S., Besra, G.S., and Brenner, M.B. (2008). NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 8339-8344.
- Lee, B.S., Lee, S.H., Feng, P., Chang, H., Cho, N.H., and Jung, J.U. (2005). Characterization of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 signalosome. *J Virol* *79*, 12173-12184.
- Lee, C.H., Melchers, M., Wang, H., Torrey, T.A., Slota, R., Qi, C.F., Kim, J.Y., Lugar, P., Kong, H.J., Farrington, L., *et al.* (2006). Regulation of the germinal center gene program by interferon (IFN) regulatory factor 8/IFN consensus sequence-binding protein. *J Exp Med* *203*, 63-72.
- Lee, H., Veazey, R., Williams, K., Li, M., Guo, J., Neipel, F., Fleckenstein, B., Lackner, A., Desrosiers, R.C., and Jung, J.U. (1998). Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat Med* *4*, 435-440.
- Lee, Y.J., Holzapfel, K.L., Zhu, J., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2013). Steady-state production of IL-4 modulates immunity in mouse strains and is determined by lineage diversity of iNKT cells. *Nat Immunol* *14*, 1146-1154.
- Lee, Y.J., Wang, H., Starrett, G.J., Phuong, V., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2015). Tissue-Specific Distribution of iNKT Cells Impacts Their Cytokine Response. *Immunity* *43*, 566-578.

- Lei, X., Zhu, Y., Jones, T., Bai, Z., Huang, Y., and Gao, S.J. (2012). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus microRNA and its variants target the transforming growth factor beta pathway to promote cell survival. *J Virol* 86, 11698-11711.
- Leite-De-Moraes, M.C., Hameg, A., Arnould, A., Machavoine, F., Koezuka, Y., Schneider, E., Herbelin, A., and Dy, M. (1999). A distinct IL-18-induced pathway to fully activate NK T lymphocytes independently from TCR engagement. *J Immunol* 163, 5871-5876.
- Lepone, L., Rappocciolo, G., Knowlton, E., Jais, M., Piazza, P., Jenkins, F.J., and Rinaldo, C.R. (2010). Monofunctional and polyfunctional CD8+ T cell responses to human herpesvirus 8 lytic and latency proteins. *Clin Vaccine Immunol* 17, 1507-1516.
- Levy, O., Orange, J.S., Hibberd, P., Steinberg, S., LaRussa, P., Weinberg, A., Wilson, S.B., Shaulov, A., Fleisher, G., Geha, R.S., *et al.* (2003). Disseminated varicella infection due to the vaccine strain of varicella-zoster virus, in a patient with a novel deficiency in natural killer T cells. *J Infect Dis* 188, 948-953.
- Li, M., Lee, H., Yoon, D.W., Albrecht, J.C., Fleckenstein, B., Neipel, F., and Jung, J.U. (1997). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J Virol* 71, 1984-1991.
- Li, Q., Means, R., Lang, S., and Jung, J.U. (2007). Downregulation of gamma interferon receptor 1 by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K3 and K5. *J Virol* 81, 2117-2127.
- Liao, W., Tang, Y., Kuo, Y.L., Liu, B.Y., Xu, C.J., and Giam, C.Z. (2003). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 transcriptional activator Rta is an oligomeric DNA-binding protein that interacts with tandem arrays of phased A/T-trinucleotide motifs. *J Virol* 77, 9399-9411.
- Liu, L., Eby, M.T., Rathore, N., Sinha, S.K., Kumar, A., and Chaudhary, P.M. (2002). The human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein physically associates with and persistently activates the I kappa B kinase complex. *J Biol Chem* 277, 13745-13751.
- Lu, F., Stedman, W., Yousef, M., Renne, R., and Lieberman, P.M. (2010). Epigenetic regulation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency by virus-encoded microRNAs that target Rta and the cellular Rbl2-DNMT pathway. *J Virol* 84, 2697-2706.
- Lu, J., Verma, S.C., Murakami, M., Cai, Q., Kumar, P., Xiao, B., and Robertson, E.S. (2009). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) upregulates survivin expression in KSHV-Associated B-lymphoma cells and contributes to their proliferation. *J Virol* 83, 7129-7141.
- Lukac, D.M., Kirshner, J.R., and Ganem, D. (1999). Transcriptional activation by the product of open reading frame 50 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells. *J Virol* 73, 9348-9361.
- Lukac, D.M., Renne, R., Kirshner, J.R., and Ganem, D. (1998). Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology* 252, 304-312.
- Lynch, L., Michelet, X., Zhang, S., Brennan, P.J., Moseman, A., Lester, C., Besra, G., Vomhof-Dekrey, E.E., Tighe, M., Koay, H.F., *et al.* (2015). Regulatory iNKT cells lack expression of the transcription factor PLZF and control the homeostasis of T(reg) cells and macrophages in adipose tissue. *Nat Immunol* 16, 85-95.
- Lynch, L., Nowak, M., Varghese, B., Clark, J., Hogan, A.E., Toxavidis, V., Balk, S.P., O'Shea, D., O'Farrelly, C., and Exley, M.A. (2012). Adipose tissue invariant NKT cells protect against diet-induced obesity and metabolic disorder through regulatory cytokine production. *Immunity* 37, 574-587.
- Lynne, J.E., Schmid, I., Matud, J.L., Hirji, K., Buessow, S., Shlian, D.M., and Giorgi, J.V. (1998). Major expansions of select CD8+ subsets in acute Epstein-Barr virus infection: comparison with chronic human immunodeficiency virus disease. *J Infect Dis* 177, 1083-1087.
- Mark, L., Lee, W.H., Spiller, O.B., Proctor, D., Blackbourn, D.J., Villoutreix, B.O., and Blom, A.M. (2004). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein mimics human molecular mechanisms for inhibition of the complement system. *J Biol Chem* 279, 45093-45101.
- Mark, L., Proctor, D.G., Blackbourn, D.J., Blom, A.M., and Spiller, O.B. (2008). Separation of decay-accelerating and cofactor functional activities of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein using monoclonal antibodies. *Immunology* 123, 228-238.

- Marshall, V., Parks, T., Bagni, R., Wang, C.D., Samols, M.A., Hu, J., Wyvil, K.M., Aleman, K., Little, R.F., Yarchoan, R., *et al.* (2007). Conservation of virally encoded microRNAs in Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in primary effusion lymphoma cell lines and in patients with Kaposi sarcoma or multicentric Castleman disease. *J Infect Dis* *195*, 645-659.
- Martin, F., Oliver, A.M., and Kearney, J.F. (2001). Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* *14*, 617-629.
- Martinon, F., Burns, K., and Tschopp, J. (2002). The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell* *10*, 417-426.
- Matolcsy, A., Nador, R.G., Cesarman, E., and Knowles, D.M. (1998). Immunoglobulin VH gene mutational analysis suggests that primary effusion lymphomas derive from different stages of B cell maturation. *Am J Pathol* *153*, 1609-1614.
- Matsuda, J.L., Gapin, L., Sidobre, S., Kieper, W.C., Tan, J.T., Ceredig, R., Surh, C.D., and Kronenberg, M. (2002). Homeostasis of V alpha 14i NKT cells. *Nat Immunol* *3*, 966-974.
- Matta, H., Sun, Q., Moses, G., and Chaudhary, P.M. (2003). Molecular genetic analysis of human herpes virus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein-induced NF-kappaB activation. *J Biol Chem* *278*, 52406-52411.
- Mattner, J., Debord, K.L., Ismail, N., Goff, R.D., Cantu, C., 3rd, Zhou, D., Saint-Mezard, P., Wang, V., Gao, Y., Yin, N., *et al.* (2005). Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections. *Nature* *434*, 525-529.
- McCormick, C., and Ganem, D. (2005). The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNAs. *Science* *307*, 739-741.
- McCormick, C., and Ganem, D. (2006). Phosphorylation and function of the kaposin B direct repeats of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* *80*, 6165-6170.
- McNab, F.W., Berzins, S.P., Pellicci, D.G., Kyriassoudis, K., Field, K., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2005). The influence of CD1d in postselection NKT cell maturation and homeostasis. *J Immunol* *175*, 3762-3768.
- Melchers, F. (2005). B cell development and its deregulation to transformed states at the pre-B cell receptor-expressing pre-BII cell stage. *Curr Top Microbiol Immunol* *294*, 1-17.
- Michel, M.L., Mendes-da-Cruz, D., Keller, A.C., Lochner, M., Schneider, E., Dy, M., Eberl, G., and Leite-de-Moraes, M.C. (2008). Critical role of ROR-gamma in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* *105*, 19845-19850.
- Miller, G., Heston, L., Grogan, E., Gradoville, L., Rigsby, M., Sun, R., Shedd, D., Kushnaryov, V.M., Grossberg, S., and Chang, Y. (1997). Selective switch between latency and lytic replication of Kaposi's sarcoma herpesvirus and Epstein-Barr virus in dually infected body cavity lymphoma cells. *J Virol* *71*, 314-324.
- Miura, S., Kawana, K., Schust, D.J., Fujii, T., Yokoyama, T., Iwasawa, Y., Nagamatsu, T., Adachi, K., Tomio, A., Tomio, K., *et al.* (2010). CD1d, a sentinel molecule bridging innate and adaptive immunity, is downregulated by the human papillomavirus (HPV) E5 protein: a possible mechanism for immune evasion by HPV. *J Virol* *84*, 11614-11623.
- Mochizuki, T., Kitanaka, C., Noguchi, K., Muramatsu, T., Asai, A., and Kuchino, Y. (1999). Physical and functional interactions between Pim-1 kinase and Cdc25A phosphatase. Implications for the Pim-1-mediated activation of the c-Myc signaling pathway. *J Biol Chem* *274*, 18659-18666.
- Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P.S., and Goldsmith, M.A. (1997). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit. *J Biol Chem* *272*, 19625-19631.
- Moll, M., Andersson, S.K., Smed-Sorensen, A., and Sandberg, J.K. (2010). Inhibition of lipid antigen presentation in dendritic cells by HIV-1 Vpu interference with CD1d recycling from endosomal compartments. *Blood* *116*, 1876-1884.
- Montaner, S. (2007). Akt/TSC/mTOR activation by the KSHV G protein-coupled receptor: emerging insights into the molecular oncogenesis and treatment of Kaposi's sarcoma. *Cell Cycle* *6*, 438-443.
- Montaner, S., Sodhi, A., Molinolo, A., Bugge, T.H., Sawai, E.T., He, Y., Li, Y., Ray, P.E., and Gutkind, J.S. (2003). Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell* *3*, 23-36.

- Montaner, S., Sodhi, A., Pece, S., Mesri, E.A., and Gutkind, J.S. (2001). The Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res* *61*, 2641-2648.
- Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., and Dorshkind, K. (2006). Identification of a B-1 B cell-specified progenitor. *Nat Immunol* *7*, 293-301.
- Moore, P.S., Boshoff, C., Weiss, R.A., and Chang, Y. (1996). Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science* *274*, 1739-1744.
- Mori, Y., Nishimoto, N., Ohno, M., Inagi, R., Dhepakson, P., Amou, K., Yoshizaki, K., and Yamanishi, K. (2000). Human herpesvirus 8-encoded interleukin-6 homologue (viral IL-6) induces endogenous human IL-6 secretion. *J Med Virol* *61*, 332-335.
- Motsinger, A., Haas, D.W., Stanic, A.K., Van Kaer, L., Joyce, S., and Unutmaz, D. (2002). CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection. *J Exp Med* *195*, 869-879.
- Muto, A., Ochiai, K., Kimura, Y., Itoh-Nakadai, A., Calame, K.L., Ikebe, D., Tashiro, S., and Igarashi, K. (2010). Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch. *EMBO J* *29*, 4048-4061.
- Mycko, M.P., Ferrero, I., Wilson, A., Jiang, W., Bianchi, T., Trumpp, A., and MacDonald, H.R. (2009). Selective requirement for c-Myc at an early stage of V(alpha)14i NKT cell development. *J Immunol* *182*, 4641-4648.
- Myoung, J., and Ganem, D. (2011). Active lytic infection of human primary tonsillar B cells by KSHV and its noncytolytic control by activated CD4+ T cells. *J Clin Invest* *121*, 1130-1140.
- Neipel, F., Albrecht, J.C., Ensser, A., Huang, Y.Q., Li, J.J., Friedman-Kien, A.E., and Fleckenstein, B. (1997a). Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6. *J Virol* *71*, 839-842.
- Neipel, F., Albrecht, J.C., and Fleckenstein, B. (1997b). Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity? *J Virol* *71*, 4187-4192.
- Nera, K.P., Kohonen, P., Narvi, E., Peippo, A., Mustonen, L., Terho, P., Koskela, K., Buerstedde, J.M., and Lassila, O. (2006). Loss of Pax5 promotes plasma cell differentiation. *Immunity* *24*, 283-293.
- Nichols, K.E., Hom, J., Gong, S.Y., Ganguly, A., Ma, C.S., Cannons, J.L., Tangye, S.G., Schwartzberg, P.L., Koretzky, G.A., and Stein, P.L. (2005). Regulation of NKT cell development by SAP, the protein defective in XLP. *Nat Med* *11*, 340-345.
- Nicol, S.M., Sabbah, S., Brulois, K.F., Jung, J.U., Bell, A.I., and Hislop, A.D. (2016). Primary B Lymphocytes Infected with Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Can Be Expanded In Vitro and Are Recognized by LANA-Specific CD4+ T Cells. *J Virol* *90*, 3849-3859.
- Nutt, S.L., Fairfax, K.A., and Kallies, A. (2007). BLIMP1 guides the fate of effector B and T cells. *Nat Rev Immunol* *7*, 923-927.
- Nutt, S.L., Heavey, B., Rolink, A.G., and Busslinger, M. (1999). Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature* *401*, 556-562.
- O'Hara, A.J., Chugh, P., Wang, L., Netto, E.M., Luz, E., Harrington, W.J., Dezube, B.J., Damania, B., and Dittmer, D.P. (2009). Pre-micro RNA signatures delineate stages of endothelial cell transformation in Kaposi sarcoma. *PLoS Pathog* *5*, e1000389.
- Ojala, P.M., Yamamoto, K., Castanos-Velez, E., Biberfeld, P., Korsmeyer, S.J., and Makela, T.P. (2000). The apoptotic v-cyclin-CDK6 complex phosphorylates and inactivates Bcl-2. *Nat Cell Biol* *2*, 819-825.
- Oksenhendler, E., Carcelain, G., Aoki, Y., Boulanger, E., Maillard, A., Clauvel, J.P., and Agbalika, F. (2000). High levels of human herpesvirus 8 viral load, human interleukin-6, interleukin-10, and C reactive protein correlate with exacerbation of multicentric castlemans disease in HIV-infected patients. *Blood* *96*, 2069-2073.
- Oliver, A.M., Martin, F., Gartland, G.L., Carter, R.H., and Kearney, J.F. (1997). Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* *27*, 2366-2374.
- Oliver, A.M., Martin, F., and Kearney, J.F. (1999). IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* *162*, 7198-7207.

- Osman, M., Kubo, T., Gill, J., Neipel, F., Becker, M., Smith, G., Weiss, R., Gazzard, B., Boshoff, C., and Gotch, F. (1999). Identification of human herpesvirus 8-specific cytotoxic T-cell responses. *J Virol* *73*, 6136-6140.
- Parravicini, C., Chandran, B., Corbellino, M., Berti, E., Paulli, M., Moore, P.S., and Chang, Y. (2000). Differential viral protein expression in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-infected diseases: Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease. *Am J Pathol* *156*, 743-749.
- Pasquier, B., Yin, L., Fondaneche, M.C., Relouzat, F., Bloch-Queyrat, C., Lambert, N., Fischer, A., de Saint-Basile, G., and Latour, S. (2005). Defective NKT cell development in mice and humans lacking the adapter SAP, the X-linked lymphoproliferative syndrome gene product. *J Exp Med* *201*, 695-701.
- Pauk, J., Huang, M.L., Brodie, S.J., Wald, A., Koelle, D.M., Schacker, T., Celum, C., Selke, S., and Corey, L. (2000). Mucosal shedding of human herpesvirus 8 in men. *N Engl J Med* *343*, 1369-1377.
- Pellicci, D.G., Hammond, K.J., Uldrich, A.P., Baxter, A.G., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2002). A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(+) CD1d-dependent precursor stage. *J Exp Med* *195*, 835-844.
- Pellicci, D.G., Uldrich, A.P., Kyriassoudis, K., Crowe, N.Y., Brooks, A.G., Hammond, K.J., Sidobre, S., Kronenberg, M., Smyth, M.J., and Godfrey, D.I. (2003). Intrathymic NKT cell development is blocked by the presence of alpha-galactosylceramide. *Eur J Immunol* *33*, 1816-1823.
- Pene, J., Gauchat, J.F., Lecart, S., Drouet, E., Guglielmi, P., Boulay, V., Delwail, A., Foster, D., Lecron, J.C., and Yssel, H. (2004). Cutting edge: IL-21 is a switch factor for the production of IgG1 and IgG3 by human B cells. *J Immunol* *172*, 5154-5157.
- Peralbo, E., Alonso, C., and Solana, R. (2007). Invariant NKT and NKT-like lymphocytes: two different T cell subsets that are differentially affected by ageing. *Exp Gerontol* *42*, 703-708.
- Pfeffer, S., Sewer, A., Lagos-Quintana, M., Sheridan, R., Sander, C., Grasser, F.A., van Dyk, L.F., Ho, C.K., Shuman, S., Chien, M., *et al.* (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* *2*, 269-276.
- Phan, T.G., Gardam, S., Basten, A., and Brink, R. (2005). Altered migration, recruitment, and somatic hypermutation in the early response of marginal zone B cells to T cell-dependent antigen. *J Immunol* *174*, 4567-4578.
- Poole, L.J., Zong, J.C., Ciuffo, D.M., Alcendor, D.J., Cannon, J.S., Ambinder, R., Orenstein, J.M., Reitz, M.S., and Hayward, G.S. (1999). Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end. *J Virol* *73*, 6646-6660.
- Portis, T., and Longnecker, R. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* *23*, 8619-8628.
- Powles, T., Stebbing, J., Bazeos, A., Hatzimichael, E., Mandalia, S., Nelson, M., Gazzard, B., and Bower, M. (2009). The role of immune suppression and HHV-8 in the increasing incidence of HIV-associated multicentric Castleman's disease. *Ann Oncol* *20*, 775-779.
- Prakash, O., Swamy, O.R., Peng, X., Tang, Z.Y., Li, L., Larson, J.E., Cohen, J.C., Gill, J., Farr, G., Wang, S., *et al.* (2005). Activation of Src kinase Lyn by the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus K1 protein: implications for lymphomagenesis. *Blood* *105*, 3987-3994.
- Prakash, O., Tang, Z.Y., Peng, X., Coleman, R., Gill, J., Farr, G., and Samaniego, F. (2002). Tumorigenesis and aberrant signaling in transgenic mice expressing the human herpesvirus-8 K1 gene. *J Natl Cancer Inst* *94*, 926-935.
- Price, A.M., and Luftig, M.A. (2015). To be or not I1b: a multi-step process for Epstein-Barr virus latency establishment and consequences for B cell tumorigenesis. *PLoS Pathog* *11*, e1004656.
- Pridans, C., Holmes, M.L., Polli, M., Wettenhall, J.M., Dakic, A., Corcoran, L.M., Smyth, G.K., and Nutt, S.L. (2008). Identification of Pax5 target genes in early B cell differentiation. *J Immunol* *180*, 1719-1728.
- Radkov, S.A., Kellam, P., and Boshoff, C. (2000). The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat Med* *6*, 1121-1127.

- Rafferty, M.J., Wolter, E., Fillatreau, S., Meisel, H., Kaufmann, S.H., and Schonrich, G. (2014). NKT cells determine titer and subtype profile of virus-specific IgG antibodies during herpes simplex virus Infection. *J Immunol* *192*, 4294-4302.
- Raghu, H., Sharma-Walia, N., Veettil, M.V., Sadagopan, S., and Chandran, B. (2009). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus utilizes an actin polymerization-dependent macropinocytic pathway to enter human dermal microvascular endothelial and human umbilical vein endothelial cells. *J Virol* *83*, 4895-4911.
- Rainbow, L., Platt, G.M., Simpson, G.R., Sarid, R., Gao, S.J., Stoiber, H., Herrington, C.S., Moore, P.S., and Schulz, T.F. (1997). The 222- to 234-kilodalton latent nuclear protein (LNA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) is encoded by orf73 and is a component of the latency-associated nuclear antigen. *J Virol* *71*, 5915-5921.
- Rappocciolo, G., Hensler, H.R., Jais, M., Reinhart, T.A., Pegu, A., Jenkins, F.J., and Rinaldo, C.R. (2008). Human herpesvirus 8 infects and replicates in primary cultures of activated B lymphocytes through DC-SIGN. *J Virol* *82*, 4793-4806.
- Rappocciolo, G., Jenkins, F.J., Hensler, H.R., Piazza, P., Jais, M., Borowski, L., Watkins, S.C., and Rinaldo, C.R., Jr. (2006). DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J Immunol* *176*, 1741-1749.
- Reimold, A.M., Ponath, P.D., Li, Y.S., Hardy, R.R., David, C.S., Strominger, J.L., and Glimcher, L.H. (1996). Transcription factor B cell lineage-specific activator protein regulates the gene for human X-box binding protein 1. *J Exp Med* *183*, 393-401.
- Renne, R., Lagunoff, M., Zhong, W., and Ganem, D. (1996). The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J Virol* *70*, 8151-8154.
- Renukaradhya, G.J., Khan, M.A., Vieira, M., Du, W., Gervay-Hague, J., and Brutkiewicz, R.R. (2008). Type I NKT cells protect (and type II NKT cells suppress) the host's innate antitumor immune response to a B-cell lymphoma. *Blood* *111*, 5637-5645.
- Renukaradhya, G.J., Webb, T.J., Khan, M.A., Lin, Y.L., Du, W., Gervay-Hague, J., and Brutkiewicz, R.R. (2005). Virus-induced inhibition of CD1d1-mediated antigen presentation: reciprocal regulation by p38 and ERK. *J Immunol* *175*, 4301-4308.
- Reth, M., and Wienands, J. (1997). Initiation and processing of signals from the B cell antigen receptor. *Annu Rev Immunol* *15*, 453-479.
- Rigaud, S., Fondaneche, M.C., Lambert, N., Pasquier, B., Mateo, V., Soulas, P., Galicier, L., Le Deist, F., Rieux-Laucat, F., Revy, P., *et al.* (2006). XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature* *444*, 110-114.
- Roark, J.H., Park, S.H., Jayawardena, J., Kavita, U., Shannon, M., and Bendelac, A. (1998). CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells. *J Immunol* *160*, 3121-3127.
- Robey, R.C., Lagos, D., Gratrix, F., Henderson, S., Matthews, N.C., Vart, R.J., Bower, M., Boshoff, C., and Gotch, F.M. (2009). The CD8 and CD4 T-cell response against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is skewed towards early and late lytic antigens. *PLoS One* *4*, e5890.
- Rossjohn, J., Pellicci, D.G., Patel, O., Gapin, L., and Godfrey, D.I. (2012). Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. *Nat Rev Immunol* *12*, 845-857.
- Russo, J.J., Bohenzky, R.A., Chien, M.C., Chen, J., Yan, M., Maddalena, D., Parry, J.P., Peruzzi, D., Edelman, I.S., Chang, Y., *et al.* (1996). Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 14862-14867.
- Sabbah, S., Jagne, Y.J., Zuo, J., de Silva, T., Ahasan, M.M., Brander, C., Rowland-Jones, S., Flanagan, K.L., and Hislop, A.D. (2012). T-cell immunity to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus: recognition of primary effusion lymphoma by LANA-specific CD4+ T cells. *Blood* *119*, 2083-2092.
- Sag, D., Krause, P., Hedrick, C.C., Kronenberg, M., and Wingender, G. (2014). IL-10-producing NKT10 cells are a distinct regulatory invariant NKT cell subset. *J Clin Invest* *124*, 3725-3740.
- Saito, M., Gao, J., Basso, K., Kitagawa, Y., Smith, P.M., Bhagat, G., Pernis, A., Pasqualucci, L., and Dalla-Favera, R. (2007). A signaling pathway mediating downregulation of BCL6 in germinal center B cells is blocked by BCL6 gene alterations in B cell lymphoma. *Cancer Cell* *12*, 280-292.
- Salio, M., Silk, J.D., Jones, E.Y., and Cerundolo, V. (2014). Biology of CD1- and MR1-restricted T cells. *Annu Rev Immunol* *32*, 323-366.

- Samols, M.A., Hu, J., Skalsky, R.L., and Renne, R. (2005). Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* *79*, 9301-9305.
- Sanchez, D.J., Gumperz, J.E., and Ganem, D. (2005). Regulation of CD1d expression and function by a herpesvirus infection. *J Clin Invest* *115*, 1369-1378.
- Sathish, N., Zhu, F.X., Golub, E.E., Liang, Q., and Yuan, Y. (2011). Mechanisms of autoinhibition of IRF-7 and a probable model for inactivation of IRF-7 by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus protein ORF45. *J Biol Chem* *286*, 746-756.
- Sbihi, Z., Dossier, A., Boutboul, D., Galicier, L., Parizot, C., Emarre, A., Hoareau, B., Dupin, N., Marcelin, A.G., Oudin, A., *et al.* (2017). iNKT and memory B-cell alterations in HHV-8 multicentric Castleman disease. *Blood* *129*, 855-865.
- Schebesta, A., McManus, S., Salvaggio, G., Delogu, A., Busslinger, G.A., and Busslinger, M. (2007). Transcription factor Pax5 activates the chromatin of key genes involved in B cell signaling, adhesion, migration, and immune function. *Immunity* *27*, 49-63.
- Schebesta, M., Pfeffer, P.L., and Busslinger, M. (2002). Control of pre-BCR signaling by Pax5-dependent activation of the BLNK gene. *Immunity* *17*, 473-485.
- Sciammas, R., Shaffer, A.L., Schatz, J.H., Zhao, H., Staudt, L.M., and Singh, H. (2006). Graded expression of interferon regulatory factor-4 coordinates isotype switching with plasma cell differentiation. *Immunity* *25*, 225-236.
- Seiler, M.P., Mathew, R., Liszewski, M.K., Spooner, C.J., Barr, K., Meng, F., Singh, H., and Bendelac, A. (2012). Elevated and sustained expression of the transcription factors Egr1 and Egr2 controls NKT lineage differentiation in response to TCR signaling. *Nat Immunol* *13*, 264-271.
- Shaffer, A.L., Emre, N.C., Lamy, L., Ngo, V.N., Wright, G., Xiao, W., Powell, J., Dave, S., Yu, X., Zhao, H., *et al.* (2008). IRF4 addiction in multiple myeloma. *Nature* *454*, 226-231.
- Shaffer, A.L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N.N., Lee, A.H., Qian, S.B., Zhao, H., Yu, X., Yang, L., Tan, B.K., Rosenwald, A., *et al.* (2004). XBP1, downstream of Blimp-1, expands the secretory apparatus and other organelles, and increases protein synthesis in plasma cell differentiation. *Immunity* *21*, 81-93.
- Shapiro-Shelef, M., and Calame, K. (2005). Regulation of plasma-cell development. *Nat Rev Immunol* *5*, 230-242.
- Sharifi, R., Sinclair, J.C., Gilmour, K.C., Arkwright, P.D., Kinnon, C., Thrasher, A.J., and Gaspar, H.B. (2004). SAP mediates specific cytotoxic T-cell functions in X-linked lymphoproliferative disease. *Blood* *103*, 3821-3827.
- Singh, V.V., Kerur, N., Bottero, V., Dutta, S., Chakraborty, S., Ansari, M.A., Paudel, N., Chikoti, L., and Chandran, B. (2013). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency in endothelial and B cells activates gamma interferon-inducible protein 16-mediated inflammasomes. *J Virol* *87*, 4417-4431.
- Sirianni, M.C., Libi, F., Campagna, M., Rossi, D., Capello, D., Sciaranghella, G., Carbone, A., Simonelli, C., Monini, P., Gaidano, G., *et al.* (2005). Downregulation of the major histocompatibility complex class I molecules by human herpesvirus type 8 and impaired natural killer cell activity in primary effusion lymphoma development. *Br J Haematol* *130*, 92-95.
- Sirianni, M.C., Vincenzi, L., Topino, S., Giovannetti, A., Mazzetta, F., Libi, F., Scaramuzzi, D., Andreoni, M., Pinter, E., Baccharini, S., *et al.* (2002). NK cell activity controls human herpesvirus 8 latent infection and is restored upon highly active antiretroviral therapy in AIDS patients with regressing Kaposi's sarcoma. *Eur J Immunol* *32*, 2711-2720.
- Skalsky, R.L., Samols, M.A., Plaisance, K.B., Boss, I.W., Riva, A., Lopez, M.C., Baker, H.V., and Renne, R. (2007). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* *81*, 12836-12845.
- Smyth, M.J., Thia, K.Y., Street, S.E., Cretney, E., Trapani, J.A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S.B., Crowe, N.Y., and Godfrey, D.I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* *191*, 661-668.
- Sodhi, A., Chaisuparat, R., Hu, J., Ramsdell, A.K., Manning, B.D., Sausville, E.A., Sawai, E.T., Molinolo, A., Gutkind, J.S., and Montaner, S. (2006). The TSC2/mTOR pathway drives endothelial cell transformation induced by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor. *Cancer Cell* *10*, 133-143.

- Song, H., and Cerny, J. (2003). Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J Exp Med* 198, 1923-1935.
- Soulier, J., Grollet, L., Oksenhendler, E., Cacoub, P., Cazals-Hatem, D., Babinet, P., d'Agay, M.F., Clauvel, J.P., Raphael, M., Degos, L., *et al.* (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castlemans disease. *Blood* 86, 1276-1280.
- Spencer, J., Perry, M.E., and Dunn-Walters, D.K. (1998). Human marginal-zone B cells. *Immunol Today* 19, 421-426.
- Spiller, O.B., Blackburn, D.J., Mark, L., Proctor, D.G., and Blom, A.M. (2003a). Functional activity of the complement regulator encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Biol Chem* 278, 9283-9289.
- Spiller, O.B., Mark, L., Blue, C.E., Proctor, D.G., Aitken, J.A., Blom, A.M., and Blackburn, D.J. (2006). Dissecting the regions of virion-associated Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus complement control protein required for complement regulation and cell binding. *J Virol* 80, 4068-4078.
- Spiller, O.B., Robinson, M., O'Donnell, E., Milligan, S., Morgan, B.P., Davison, A.J., and Blackburn, D.J. (2003b). Complement regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein. *J Virol* 77, 592-599.
- Stanic, A.K., Bezbradica, J.S., Park, J.J., Van Kaer, L., Boothby, M.R., and Joyce, S. (2004). Cutting edge: the ontogeny and function of Va14Ja18 natural T lymphocytes require signal processing by protein kinase C theta and NF-kappa B. *J Immunol* 172, 4667-4671.
- Stine, J.T., Wood, C., Hill, M., Epp, A., Raport, C.J., Schweickart, V.L., Endo, Y., Sasaki, T., Simmons, G., Boshoff, C., *et al.* (2000). KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood* 95, 1151-1157.
- Suffert, G., Malterer, G., Hausser, J., Viiliainen, J., Fender, A., Contrant, M., Ivacevic, T., Benes, V., Gros, F., Voinnet, O., *et al.* (2011). Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs target caspase 3 and regulate apoptosis. *PLoS Pathog* 7, e1002405.
- Sullivan, C.S., Grundhoff, A., Tevethia, S., Treisman, R., Pipas, J.M., and Ganem, D. (2006). Expression and function of microRNAs in viruses great and small. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71, 351-356.
- Sun, R., Lin, S.F., Gradoville, L., Yuan, Y., Zhu, F., and Miller, G. (1998). A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 10866-10871.
- Suscovich, T.J., Paulose-Murphy, M., Harlow, J.D., Chen, Y., Thomas, S.Y., Mellott, T.J., Walker, B.D., Scadden, D.T., Zeichner, S., and Brander, C. (2004). Defective immune function of primary effusion lymphoma cells is associated with distinct KSHV gene expression profiles. *Leuk Lymphoma* 45, 1223-1238.
- Suthaus, J., Stuhlmann-Laeisz, C., Tompkins, V.S., Rosean, T.R., Klapper, W., Tosato, G., Janz, S., Scheller, J., and Rose-John, S. (2012). HHV-8-encoded viral IL-6 collaborates with mouse IL-6 in the development of multicentric Castleman disease in mice. *Blood* 119, 5173-5181.
- Tang, Q., Qin, D., Lv, Z., Zhu, X., Ma, X., Yan, Q., Zeng, Y., Guo, Y., Feng, N., and Lu, C. (2012). Herpes simplex virus type 2 triggers reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus from latency and collaborates with HIV-1 Tat. *PLoS One* 7, e31652.
- Taniguchi, M., Tashiro, T., Dashtsoodol, N., Hongo, N., and Watarai, H. (2010). The specialized iNKT cell system recognizes glycolipid antigens and bridges the innate and acquired immune systems with potential applications for cancer therapy. *Int Immunol* 22, 1-6.
- Tarte, K., De Vos, J., Thykjaer, T., Zhan, F., Fiol, G., Costes, V., Reme, T., Legouffe, E., Rossi, J.F., Shaughnessy, J., Jr., *et al.* (2002). Generation of polyclonal plasmablasts from peripheral blood B cells: a normal counterpart of malignant plasmablasts. *Blood* 100, 1113-1122.
- Tarte, K., Zhan, F., De Vos, J., Klein, B., and Shaughnessy, J., Jr. (2003). Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 102, 592-600.
- Taubenheim, N., Tarlinton, D.M., Crawford, S., Corcoran, L.M., Hodgkin, P.D., and Nutt, S.L. (2012). High rate of antibody secretion is not integral to plasma cell differentiation as revealed by XBP-1 deficiency. *J Immunol* 189, 3328-3338.

- Taylor, J.L., Bennett, H.N., Snyder, B.A., Moore, P.S., and Chang, Y. (2005). Transcriptional analysis of latent and inducible Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus transcripts in the K4 to K7 region. *J Virol* 79, 15099-15106.
- Thomas, M., Boname, J.M., Field, S., Nejentsev, S., Salio, M., Cerundolo, V., Wills, M., and Lehner, P.J. (2008). Down-regulation of NKG2D and NKp80 ligands by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K5 protects against NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1656-1661.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinel, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J.L., Schroter, M., *et al.* (1997). Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386, 517-521.
- Todd, D.J., McHeyzer-Williams, L.J., Kowal, C., Lee, A.H., Volpe, B.T., Diamond, B., McHeyzer-Williams, M.G., and Glimcher, L.H. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *J Exp Med* 206, 2151-2159.
- Tomescu, C., Law, W.K., and Kedes, D.H. (2003). Surface downregulation of major histocompatibility complex class I, PE-CAM, and ICAM-1 following de novo infection of endothelial cells with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 77, 9669-9684.
- Tomlinson, C.C., and Damania, B. (2004). The K1 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus activates the Akt signaling pathway. *J Virol* 78, 1918-1927.
- Tomlinson, C.C., and Damania, B. (2008). Critical role for endocytosis in the regulation of signaling by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K1 protein. *J Virol* 82, 6514-6523.
- Tonti, E., Fedeli, M., Napolitano, A., Iannacone, M., von Andrian, U.H., Guidotti, L.G., Abrignani, S., Casorati, G., and Dellabona, P. (2012). Follicular helper NKT cells induce limited B cell responses and germinal center formation in the absence of CD4(+) T cell help. *J Immunol* 188, 3217-3222.
- Tormo, A.J., Meliani, Y., Beaupre, L.A., Sharma, M., Fritz, J.H., Elson, G., Crabe, S., and Gauchat, J.F. (2013). The composite cytokine p28/cytokine-like factor 1 sustains B cell proliferation and promotes plasma cell differentiation. *J Immunol* 191, 1657-1665.
- Tupin, E., Kinjo, Y., and Kronenberg, M. (2007). The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 5, 405-417.
- van der Vliet, H.J., van Vonderen, M.G., Molling, J.W., Bontkes, H.J., Reijm, M., Reiss, P., van Agtmael, M.A., Danner, S.A., van den Eertwegh, A.J., von Blumberg, B.M., *et al.* (2006). Cutting edge: Rapid recovery of NKT cells upon institution of highly active antiretroviral therapy for HIV-1 infection. *J Immunol* 177, 5775-5778.
- van der Vliet, H.J., von Blumberg, B.M., Hazenberg, M.D., Nishi, N., Otto, S.A., van Benthem, B.H., Prins, M., Claessen, F.A., van den Eertwegh, A.J., Giaccone, G., *et al.* (2002). Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection. *J Immunol* 168, 1490-1495.
- Vasan, S., Poles, M.A., Horowitz, A., Siladji, E.E., Markowitz, M., and Tsuji, M. (2007). Function of NKT cells, potential anti-HIV effector cells, are improved by beginning HAART during acute HIV-1 infection. *Int Immunol* 19, 943-951.
- Vasan, S., and Tsuji, M. (2010). A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Seminars in immunology* 22, 87-96.
- Venkataswamy, M.M., and Porcelli, S.A. (2010). Lipid and glycolipid antigens of CD1d-restricted natural killer T cells. *Semin Immunol* 22, 68-78.
- Verma, S.C., Borah, S., and Robertson, E.S. (2004). Latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus up-regulates transcription of human telomerase reverse transcriptase promoter through interaction with transcription factor Sp1. *J Virol* 78, 10348-10359.
- Verschuren, E.W., Hodgson, J.G., Gray, J.W., Kogan, S., Jones, N., and Evan, G.I. (2004). The role of p53 in suppression of KSHV cyclin-induced lymphomagenesis. *Cancer Res* 64, 581-589.
- Victoria, G.D., Schwickert, T.A., Fooksman, D.R., Kamphorst, A.O., Meyer-Hermann, M., Dustin, M.L., and Nussenzweig, M.C. (2010). Germinal center dynamics revealed by multiphoton microscopy with a photoactivatable fluorescent reporter. *Cell* 143, 592-605.
- Vieira, J., O'Hearn, P., Kimball, L., Chandran, B., and Corey, L. (2001). Activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) lytic replication by human cytomegalovirus. *J Virol* 75, 1378-1386.
- Vinuesa, C.G., Tangye, S.G., Moser, B., and Mackay, C.R. (2005). Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 5, 853-865.

- Vomhof-DeKrey, E.E., Yates, J., and Leadbetter, E.A. (2014). Invariant NKT cells provide innate and adaptive help for B cells. *Curr Opin Immunol* 28, 12-17.
- von Bulow, G.U., van Deursen, J.M., and Bram, R.J. (2001). Regulation of the T-independent humoral response by TACI. *Immunity* 14, 573-582.
- Wan, X., Wang, H., and Nicholas, J. (1999). Human herpesvirus 8 interleukin-6 (vIL-6) signals through gp130 but has structural and receptor-binding properties distinct from those of human IL-6. *J Virol* 73, 8268-8278.
- Wang, F.Z., Akula, S.M., Sharma-Walia, N., Zeng, L., and Chandran, B. (2003). Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J Virol* 77, 3131-3147.
- Wang, Q.J., Jenkins, F.J., Jacobson, L.P., Kingsley, L.A., Day, R.D., Zhang, Z.W., Meng, Y.X., Pellett, P.E., Kousoulas, K.G., Baghian, A., *et al.* (2001). Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8(+) T-cell response to viral lytic cycle proteins. *Blood* 97, 2366-2373.
- Watarai, H., Sekine-Kondo, E., Shigeura, T., Motomura, Y., Yasuda, T., Satoh, R., Yoshida, H., Kubo, M., Kawamoto, H., Koseki, H., *et al.* (2012). Development and function of invariant natural killer T cells producing T(h)2- and T(h)17-cytokines. *PLoS Biol* 10, e1001255.
- Weber, K.S., Grone, H.J., Rocken, M., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Proudfoot, A.E., Nelson, P.J., and Weber, C. (2001). Selective recruitment of Th2-type cells and evasion from a cytotoxic immune response mediated by viral macrophage inhibitory protein-II. *Eur J Immunol* 31, 2458-2466.
- Wei, D.G., Lee, H., Park, S.H., Beaudoin, L., Teyton, L., Lehuen, A., and Bendelac, A. (2005). Expansion and long-range differentiation of the NKT cell lineage in mice expressing CD1d exclusively on cortical thymocytes. *J Exp Med* 202, 239-248.
- Weller, S., Braun, M.C., Tan, B.K., Rosenwald, A., Cordier, C., Conley, M.E., Plebani, A., Kumararatne, D.S., Bonnet, D., Tournilhac, O., *et al.* (2004). Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* 104, 3647-3654.
- Wen, K.W., and Damania, B. (2010). Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1. *Oncogene* 29, 3532-3544.
- West, J., and Damania, B. (2008). Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. *J Virol* 82, 5440-5449.
- West, J.A., Gregory, S.M., Sivaraman, V., Su, L., and Damania, B. (2011). Activation of plasmacytoid dendritic cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 85, 895-904.
- Wilson, S.J., Tsao, E.H., Webb, B.L., Ye, H., Dalton-Griffin, L., Tsantoulas, C., Gale, C.V., Du, M.Q., Whitehouse, A., and Kellam, P. (2007). X box binding protein XBP-1s transactivates the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) ORF50 promoter, linking plasma cell differentiation to KSHV reactivation from latency. *J Virol* 81, 13578-13586.
- Wu, D.Y., Segal, N.H., Sidobre, S., Kronenberg, M., and Chapman, P.B. (2003). Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp Med* 198, 173-181.
- Xu, W., Joo, H., Clayton, S., Dullaers, M., Herve, M.C., Blankenship, D., De La Morena, M.T., Balderas, R., Picard, C., Casanova, J.L., *et al.* (2012). Macrophages induce differentiation of plasma cells through CXCL10/IP-10. *J Exp Med* 209, 1813-1823, S1811-1812.
- Xu, Y., AuCoin, D.P., Huete, A.R., Cei, S.A., Hanson, L.J., and Pari, G.S. (2005). A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50 deletion mutant is defective for reactivation of latent virus and DNA replication. *J Virol* 79, 3479-3487.
- Yan, B., Zemskova, M., Holder, S., Chin, V., Kraft, A., Koskinen, P.J., and Lilly, M. (2003). The PIM-2 kinase phosphorylates BAD on serine 112 and reverses BAD-induced cell death. *J Biol Chem* 278, 45358-45367.
- Yang, O.O., Wilson, S.B., Hultin, L.E., Detels, R., Hultin, P.M., Ibarondo, F.J., and Jamieson, B.D. (2007). Delayed reconstitution of CD4+ iNKT cells after effective HIV type 1 therapy. *AIDS Res Hum Retroviruses* 23, 913-922.
- Yang, T.Y., Chen, S.C., Leach, M.W., Manfra, D., Homey, B., Wiekowski, M., Sullivan, L., Jenh, C.H., Narula, S.K., Chensue, S.W., *et al.* (2000). Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 191, 445-454.

- Ye, F., Zhou, F., Bedolla, R.G., Jones, T., Lei, X., Kang, T., Guadalupe, M., and Gao, S.J. (2011). Reactive oxygen species hydrogen peroxide mediates Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reactivation from latency. *PLoS Pathog* 7, e1002054.
- Yogev, O., Lagos, D., Enver, T., and Boshoff, C. (2014). Kaposi's sarcoma herpesvirus microRNAs induce metabolic transformation of infected cells. *PLoS Pathog* 10, e1004400.
- Yoo, J., Kang, J., Lee, H.N., Aguilar, B., Kafka, D., Lee, S., Choi, I., Lee, J., Ramu, S., Haas, J., *et al.* (2010). Kaposin-B enhances the PROX1 mRNA stability during lymphatic reprogramming of vascular endothelial cells by Kaposi's sarcoma herpes virus. *PLoS Pathog* 6, e1001046.
- Yu, Y., Wang, S.E., and Hayward, G.S. (2005). The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity* 22, 59-70.
- Yuan, W., Dasgupta, A., and Cresswell, P. (2006). Herpes simplex virus evades natural killer T cell recognition by suppressing CD1d recycling. *Nat Immunol* 7, 835-842.
- Zaldumbide, A., Ossevoort, M., Wiertz, E.J., and Hoeben, R.C. (2007). In cis inhibition of antigen processing by the latency-associated nuclear antigen I of Kaposi sarcoma herpes virus. *Mol Immunol* 44, 1352-1360.
- Zeng, S.G., Ghnewa, Y.G., O'Reilly, V.P., Lyons, V.G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Exley, M.A., and Doherty, D.G. (2013). Human invariant NKT cell subsets differentially promote differentiation, antibody production, and T cell stimulation by B cells in vitro. *J Immunol* 191, 1666-1676.
- Zhong, W., Wang, H., Herndier, B., and Ganem, D. (1996). Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 6641-6646.
- Zhu, F.X., King, S.M., Smith, E.J., Levy, D.E., and Yuan, Y. (2002). A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 phosphorylation and nuclear accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5573-5578.
- Zietara, N., Lyszkiewicz, M., Krueger, A., and Weiss, S. (2011). ICOS-dependent stimulation of NKT cells by marginal zone B cells. *Eur J Immunol* 41, 3125-3134.