



Rôle des virus EBV et VIH dans la formation de la translocation chromosomique t(8;14) du Lymphome de Burkitt

Fatimata Bintou Sall

► To cite this version:

Fatimata Bintou Sall. Rôle des virus EBV et VIH dans la formation de la translocation chromosomique t(8;14) du Lymphome de Burkitt. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Paris-Saclay; Université Cheikh Anta Diop (Dakar), 2021. Français. NNT : 2021UPASL034 . tel-03275207

HAL Id: tel-03275207

<https://theses.hal.science/tel-03275207>

Submitted on 30 Jun 2021

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.

**Rôle des virus EBV et VIH dans la formation de la
translocation chromosomique t(8 ;14) du
Lymphome de Burkitt**

**Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay en cotutelle
avec l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar**

École doctorale n° 582 cancérologie : biologie - médecine - santé (CBMS)

Spécialité de doctorat : Aspects moléculaires et cellulaires de la Biologie

Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CNRS, Institut Gustave Roussy, Aspects
métaboliques et systémiques de l'oncogenèse pour de nouvelles approches
thérapeutiques, 94805, Villejuif, France.

Référent : Faculté de Médecine

Thèse présentée et soutenue en vidéoconférence

le 18 mai 2021, par

Fatimata Bintou SALL

Composition du Jury

Murat SAPARBAEV

Directeur de recherche, CNRS, Université Paris-Saclay

Président

Henri GRUFFAT

Directeur de recherche, INSERM

Rapporteur et Examineur

Rokhaya NDIAYE

Professeur, UCAD

Rapporteur et Examineur

Saliou DIOP

Professeur, UCAD

Examineur

Yegor VASSETZKY

Directeur de recherche, CNRS

Directeur de thèse

Awa Oumar TOURE

Professeur, UCAD

Co-directrice de thèse



UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR

FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

Ecole doctorale Sciences de la Vie, de la Santé et de l'Environnement



Année : 2021

N°

Rôle des virus EBV et VIH dans la formation de la translocation chromosomique t(8 ;14) du Lymphome de Burkitt

Thèse de doctorat de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar en
cotutelle avec l'Université Paris-Saclay

Spécialité : Biologie, Nutrition et Pathologies Humaines

Présentée et soutenue en vidéoconférence

le 18 mai 2021, par

Fatimata Bintou SALL

MEMBRES DU JURY

Président	M. Murat	SAPARBAEV	Directeur de recherche, CNRS
Rapporteur et Examineur	M. Henri	GRUFFAT	Directeur de recherche, INSERM
Rapporteur et Examineur	Mme Rokhaya	NDIAYE	Professeur, UCAD
Examineur	M. Saliou	DIOP	Professeur, UCAD
Directeur de thèse	M. Yegor	VASSETZKY	Directeur de recherche, CNRS
Co-directrice de thèse	Mme Awa Oumar	TOURE	Professeur, UCAD

Mes sincères remerciements...

Aux membres du jury

Je remercie chaleureusement le Dr Murat SAPARBAEV d'avoir accepté d'examiner ce manuscrit et de présider mon jury de soutenance. Mes remerciements vont également à l'endroit du Pr Saliou DIOP, qui a toujours été une référence pour nous et a guidé nos pas dans la belle spécialité qu'est l'hématologie. Veuillez recevoir mes chaleureuses remerciements pour avoir accepté d'examiner ce travail. Je remercie très sincèrement Dr Henri GRUFFAT et Pr Rokhaya NDIAYE DIALLO pour la spontanéité avec laquelle vous avez accepté d'être membre de mon jury de thèse en tant que rapporteur, et ce malgré votre emploi du temps chargé.

A mes directeurs de thèse

Dr Yegor VASSETZKY ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir fait confiance en m'acceptant dans votre équipe, d'abord comme stagiaire M2 puis comme doctorante. Merci Yegor pour votre simplicité, pour votre disponibilité, pour toutes les qualités scientifiques que vous nous avez enseignées tout le long de ces quatre années, sans oublier les moments de convivialité au restaurant avec tous les membres de l'équipe. J'espère que nous aurons la possibilité de poursuivre cette collaboration fructueuse dans un avenir proche. большое спасибо.

Pr Awa Oumar TOURE ! Merci d'avoir toujours cru en moi. Vous m'avez coaché pendant mes quatre années d'Internat des Hôpitaux de Dakar, vous avez dirigé mes travaux de thèse de doctorat d'état de médecine, de mémoire de master d'hématologie biologique, de mémoire de diplôme d'études spécialisées de biologie clinique et vous avez une fois de plus répondu présente pour m'accompagner, me guider, me conseiller et me soutenir tout le long de ces quatre années de PhD. Toute ma reconnaissance et ma gratitude !

A tous les membres de l'ex-UMR 8126 et de l'actuelle UMR 9018-METSY, plus particulièrement :

A Joëlle WIELS et Marc LIPINSKI ! Merci de m'avoir accueilli dans l'unité, merci pour vos conseils, et vos pertinentes suggestions. Merci de m'avoir accompagné dans toutes mes démarches de demande de financement par vos précieuses lettres de recommandation. Je remercie également Pierre BUSSON pour ses suggestions de qualité mais aussi pour le matériel prêté pendant 6 mois lors de mon premier déplacement au Sénégal en 2018.

A Diego GERMINI ! Quand je venais d'arriver au laboratoire, je n'avais jamais fait aucune technique de biologie moléculaire, ni de cytogénétique, tout cela n'était que pure théorie dans ma tête. Aujourd'hui, grâce à toi, Reynand me qualifie d'experte en 3D-FISH 😊. Merci de m'avoir appris toutes ces techniques, merci d'avoir toujours été disponible, d'avoir été là dans les moments de doutes et de découragement quand les manips ne marchaient pas. GRAZIE MOLTO !

A Muriel FUCHS ! Merci d'avoir toujours été gentille avec moi, merci d'avoir facilité mon intégration au sein de l'unité ; merci de t'être toujours soucieuse de comment j'allais, comment allait ma famille au Sénégal et de l'état d'avancement de mes travaux. Ces marques d'affection m'ont beaucoup aidé à surmonter le choc du dépaysement au début de mon séjour.

A tous mes collègues doctorants et post-doctorants ! Une mention très spéciale à Reynand, Yin Xing, Burkit et Alberto avec qui j'ai une relation très spéciale, au-delà du cadre professionnel. Vous côtoyer a sans nul doute été le moteur de mon épanouissement au labo. Merci pour tous les moments de délire passés ensemble, merci pour les discussions intéressantes qui touchaient à tout, merci d'avoir partagé avec moi les cultures de vos pays respectifs. J'espère de tout cœur que nous pourrions réaliser ensemble

notre projet de visiter nos différents pays : de la Chine au Sénégal, en passant par les Philippines, le Kazakhstan et la Mexique. Merci spécial à Burkit pour avoir partagé avec moi ton compte « biorender » qui m'a été très utile pour la confection des schémas. Merci aussi à Rawan, tu n'es plus au labo mais je n'ai pas oublié ton accueil chaleureux et ton soutien sans faille quand je venais d'arriver au labo. Merci à Flo pour le coaching et le soutien dans la dernière ligne droite.

A mes très chères Lorène, Désirée et Amel « coup de cœur éternel », vous ne pouvez pas mesurer le rôle que votre passage au labo a joué dans mon bien être moral et psychologique. Vous avez apporté du soleil à mes journées et vous continuez de le faire. Je remercie le bon Dieu de vous avoir mis sur mon chemin.

A tous les membres des Laboratoires d'Hématologie de l'HALD/HDJ

Merci au Pr Abibatou SALL pour tes encouragements, ton soutien sans faille et tes précieux conseils ; à l'équipe de choc Ouzin, Clémentine, Aïssatou, Serge et Marie pour avoir coordonné et géré certains prélèvements sanguins pour les enfants ; au major Hawa pour m'avoir facilité la disponibilité de certains matériels ; aux Drs Sène et Nafi et à toute l'équipe, MERCI pour le soutien et les prières.

A Martine RAPHAËL ! Tout ceci a été possible en grande partie grâce à vous. Je ne saurais ne pas vous remercier chaleureusement pour m'avoir présentée à Yegor et pour tout ce que vous avez fait et continuez de faire pour l'équipe de Dakar.

A nos collaborateurs ! Merci au Service d'Immunologie clinique de l'Hôpital Saint-Louis pour les échantillons des patients VIH et à l'Etablissement Français du sang du même hôpital pour les anneaux de cytophérèse des donneurs de sang. Merci au Dr Emmanuel DROUET pour les anticorps anti Zebra et au Pr Henri Jacques DELECLUSE pour les lignées cellulaires lymphoblastoïdes M81 et B048. Je remercie également mes collaborateurs du Sénégal. Drs Mimi, Keita, Ndongo et l'interne Pape Malick du service de Pédiatrie de l'HALD ; Dr Boiro et les internes Serigne Tawa et Mouhamet du service de Pédiatrie d'Abass Ndao, merci de m'avoir facilité le recrutement des enfants. Merci au Dr Moussa Ndour pour m'avoir ouvert les portes du l'unité d'Immunologie du LBV de l'HALD et au Dr Edgar MACONDO du laboratoire Bio 24 pour la disponibilité des containers d'azote liquide.

A Léa POISOT, gestionnaire pédagogique de l'Ecole doctorale CBMS 582 ! Un grand merci pour votre gentillesse, votre disponibilité et votre réactivité, toujours disposée à trouver des solutions à nos problèmes.

A l'Institut Servier et au Service de Coopération et d'Action culturelle de l'ambassade de France au Sénégal qui ont financé mes séjours en France. Une mention spéciale à Mme Sokhna KANE, l'assistante-gestionnaire des bourses, missions et invitations de l'ambassade de France au Sénégal.

A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail...

MERCI

Je dédie ce travail

A Papa et Maman,

Vous qui avez sacrifié toute votre vie, pour nous mettre dans de bonnes conditions, nous éduquer et nous voir réussir. Les mots ne seront jamais suffisants pour vous exprimer mon amour et ma reconnaissance. Je prie le Tout Puissant pour qu'il vous protège et vous garde encore et encore longtemps.

A mon mari,

Merci pour ton soutien INCONDITIONNEL. Smiloutou et Marie-Yama 😊, je ne vous oublie pas, merci pour toute l'affection que vous me portez. Je vous aime.

A mes frères et sœurs

Fata, compagnon de guerre de longue date, ton épouse Adama et mes deux loulous Amsita et Cheikh; mes grandes petites sœurs et fidèles conseillères Leysa et Maya ; mon fidèle garde du corps Alpha. Des valeurs sûres, sur qui je pourrai toujours compter. L'affection que je vous porte est sans limite.

A la famille SALL d'Ivry-Sur-Seine

Padou, de Hamo 3 à Ivry-sur-Seine, en passant par Hamo Tefess, Mermoz et UVA. Tu as toujours été présent. Je n'oublie pas ta tendre épouse Aby, qui m'a adopté dès le premier jour ainsi que mes deux bouts de chou Cira et Mouhamadou. Je vous porte dans mon cœur <3 <3 <3.

A la famille SALL de Saint-Herblon

Merci pour les week-end et fêtes de Noël passés ensemble !

A mes oncles et tantes, cousins et cousines

Il serait trop long de vous citer individuellement au risque d'en oublier, mais je suis consciente que vos encouragements et prières m'ont toujours accompagnée. Clin d'œil spécial à Vénus, Maguette, Djiby et Yoro.

A ma famille spirituelle

El Hadji MBCTT, MERCI pour ce que vous avez fait de nous. A tous les membres de la Dahiratou Maqâma Ibrahima, merci pour le soutien et les prières.

A mes amis et/ou collègues

Bibiche, Kalsoum, Aïda, Adjistros, Coura, Khary, Cogna, Fafa, Yacine, Clarice, Ngoné, Aïssatou, Nata, Diama, Najah, Ndèye Woré, Mami Diop, Le Cheikh, Souleymane, Baidy, Talisman, vous avez été une force et une source de motivation pour moi. Vous savez toute l'affection que j'ai pour vous. Merci d'avoir toujours été présents dans les bons comme dans les mauvais moments.

A notre regrettée Rosita Accardi

Je sais que tu aurais aimé suivre ce travail jusqu'au bout, que tu aurais souhaité finaliser notre collaboration pour une étude sur les lymphomes de Burkitt endémiques. Reposes en paix !

A tous les patients arrachés à l'affection de leurs parents, proches, amis et collaborateurs du fait de cancer et à tous ceux qui continuent de lutter contre le cancer...

Ce travail est le vôtre...

Table des matières

Liste des abréviations	12
Listes des figures	15
Liste des tableaux	17
Introduction générale	18
Revue de la littérature	21
1. Noyau des cellules eucaryotes et organisation de l'architecture nucléaire	22
1.1. Structure et contenu du noyau	23
1.2. Organisation de l'architecture nucléaire	26
1.3. Facteurs déterminants la répartition des chromosomes dans l'espace nucléaire	31
2. Mécanismes des translocations chromosomiques	34
2.1. Définition	35
2.2. Cassures double brin d'ADN	36
2.2.1. CDBs initiées par les RAG dans les lymphocytes B	37
2.2.2. CDBs initiées par AID dans les lymphocytes B	40
2.2.3. Autres sources de CDBs d'ADN	41
2.3. Réponse aux CDBs et réparation de l'ADN	42
2.3.1. La réponse aux CDBs d'ADN (DDR)	43
2.3.2. La Réparation Non-Homologue des CDBs (NHEJ)	45
2.3.2.1. Mécanismes de réparation par cNHEJ	46
2.3.2.2. Mécanismes de réparation par aNHEJ	47
2.4. Proximité spatiale entre les deux loci	48
2.4.1. Arguments en faveur de la corrélation entre proximité spatiale et fréquence de translocation	48
2.4.2. Mécanismes cellulaires d'induction de la proximité spatiale	50
2.5. Article 1 : Revue « Effects of environmental factors on nuclear organization and transformation of human B lymphocytes »	52
3. Virus Epstein-Barr	63
3.1. Définition et classification	64
3.2. Propriétés du virus EBV	64
3.2.1. Structure	64
3.2.1.1. Génome du virus	65
3.2.1.2. Produits des gènes viraux et fonctions protéiques	66
3.2.2. Cycle biologique	70

3.2.2.1.	Contamination -----	70
3.2.2.2.	Cellules cibles-----	71
3.2.2.3.	Cycle de vie dans les lymphocytes B -----	71
3.3.	Epidémiologie -----	75
3.4.	Pathologies associées -----	76
3.5.	Oncogenèse liée au virus EBV -----	78
3.5.1.	Effets oncogènes des protéines de latence et des transcrits non-codant -----	79
3.5.2.	Effets oncogènes des protéines du cycle lytique-----	84
3.6.	Article 2: Oncogenic properties of the EBV Zebra protein -----	85
4.	Virus de l'Immunodéficience Humaine.....	113
4.1.	Définition et classification-----	114
4.2.	Propriétés du VIH-1 -----	114
4.2.1.	Structure -----	114
4.2.1.1.	Structure générale -----	114
4.2.1.2.	Génome viral et produits des gènes viraux -----	115
4.2.2.	Cycle biologique-----	116
4.2.2.1.	Contamination -----	116
4.2.2.2.	Cellules cibles-----	116
4.2.2.3.	Cycle de vie dans l'organisme -----	117
4.3.	La protéine Tat -----	119
4.3.1.	Structure et organisation fonctionnelle -----	119
4.3.2.	Localisation -----	119
4.3.3.	Effets biologiques -----	120
4.3.3.1.	Tat intracellulaire -----	120
4.3.3.2.	Tat extracellulaire -----	121
4.4.	Pathologies associées au VIH-1 -----	122
4.5.	Oncogenèse liée au VIH-1 -----	123
5.	Lymphome de Burkitt.....	129
5.1.	Définition et historique -----	130
5.2.	Formes cliniques-----	131
5.2.1.	La forme endémique (LBe) -----	131
5.2.2.	La forme sporadique (LBs) -----	131
5.2.3.	La forme liée à un déficit immunitaire -----	131
5.3.	Profil cytogénétique et moléculaire -----	132
5.4.	Etiopathogénie -----	135
5.4.1.	Origine de la cellule du LB -----	135

5.4.2.	Rôle de la surexpression de MYC -----	136
5.4.3.	Rôle du virus EBV -----	137
5.4.4.	Rôle du VIH -----	140
5.4.5.	Rôle du <i>Plasmodium falciparum</i> -----	141
5.4.6.	Autres facteurs étiologiques -----	143
Question de recherche, hypothèses et objectifs -----		146
Méthodologie -----		148
1.	Modèles cellulaires et culture.....	150
1.1.	Lymphocytes B -----	150
1.2.	Lignées cellulaires lymphoblastoïde (LCLs)-----	152
1.3.	Modèles expérimentaux LCLs RPMI 8866 génétiquement modifiées -----	153
1.4.	Lignée cellulaire Jurkat -----	155
2.	Traitement des cellules	155
3.	Western Blot.....	156
4.	Extraction d'ARN et Quantitative RT-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)	158
5.	Extraction d'ADN et Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	159
6.	Hybridation in situ par Fluorescence (FISH).....	160
6.1.	3D-FISH-----	160
6.2.	Immuno-3D FISH-----	163
6.3.	FISH en suspension-----	163
7.	Acquisition et analyse des images après la FISH	164
8.	Cytométrie en flux (FACS)	164
9.	Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP) sur ChIP.....	165
10.	Patients.....	165
10.1.	Considérations éthiques-----	165
10.2.	Recrutement des patients et prélèvements sanguins-----	165
10.3.	Sérologie EBV et classification des enfants en fonction du profil sérologique -----	167
11.	Analyses statistiques	169
Résultats -----		170
1.	Article 3 : La réactivation du virus EBV induit la proximité des loci <i>MYC</i> et <i>IGH</i> dans les cellules B infectées favorisant leur translocation.....	171
2.	Position des loci <i>MYC</i> et <i>IGH</i> dans les lymphocytes B d'enfants Sénégalais infectés par le virus EBV	206
2.1.	Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et profil sérologique des enfants inclus ----	207

2.2.	Colocalisation <i>MYC-IGH</i> dans les lymphocytes B circulants des enfants-----	209
2.3.	Optimisation d'une technique pour l'isolement des lymphocytes B circulant EBV positif des enfants-----	210
3.	Article 4 : La protéine Tat du VIH-1 induit une expression aberrante de l'enzyme AICDA dans les lymphocytes B.....	212
Discussion-----		221
1.	<i>In vitro</i> , le cycle lytique du virus EBV favorise la proximité spatiale de <i>MYC</i> et <i>IGH</i> et augmente la probabilité de survenue de la translocation <i>MYC-IGH</i>	222
2.	Par quel(s) mécanisme(s) la réactivation du virus EBV induit la proximité de <i>MYC</i> et <i>IGH</i> ?	223
3.	Que se passe-t-il dans les lymphocytes B d'enfants infectés par EBV et vivant en zones d'endémie ?.....	226
4.	La protéine Tat du VIH-1 induit une expression aberrante du gène AICDA	227
5.	Modèles proposés pour l'origine de la translocation chromosomique t(8 ;14) dans les différentes formes cliniques de Lymphome de Burkitt	228
Conclusion et perspectives-----		235
Annexes-----		239
1.	Liste des publications	240
2.	Liste des communications orales	241
3.	Liste des communications affichées.....	242
4.	Article 5 : Remodelage nucléaire à grande échelle et dérégulation transcriptionnelle sur les deux chromosomes dérivés après la translocation chromosomique du Lymphome de Manteau	243
Références Bibliographiques-----		274

Liste des abréviations

µg	microgramme
µm	micromètre
µM	micromolaire
3D	tridimensionnelle
53BP1	p53 binding protein 1
aa	acide aminé
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNv	ADN viral
AICDA/AID	Activation-induced cytidine deaminase
aNHEJ	alternative NHEJ
ARN	Acide ribonucléique
ARNg	ARN guide
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNv	ARN viral
ARV	Antirétroviral
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
BCR	B cell receptor
BRCA1	Breast cancer type 1 susceptibility protein
BSA	Bovine serum albumin
Cas9	CRISPR associated protein 9
CCL	C-C chemokine ligand
CCR	C-C Chemokine receptor
CD	Cluster de différenciation
CDB	Cassure double brin d'ADN
CG	Centre germinatif
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CHK2	Checkpoint kinase 2
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
cNHEJ	classical NHEJ
CNP	Carcinome du nasopharynx
CO₂	Dioxyde de carbone
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSR	Class switch recombination
CTCF	CCCTC-binding factor
CTs	chromosomes territories
CXCR	C-X-C chemokine receptor
DAPI	DiAmidino Phenyl Indol
DDR	DNA damage response
DL	Duplicated Sequence Left
DNA-PKcs	Sous unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN
DR	Duplicated Sequence Right
DTA	Domaine de transactivation

EBERs	EBV-encoded small RNA
EBNA	Epstein-Barr Nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
EMT	Epithelial mesenchymal transition
ERK	Extracellular signal regulated kinases
FISH	Fluorescence in situ hybridization
gp	glycoprotéine
HPV	Humana papilloma virus
HR	Homologous recombination
HRP	Horseradish peroxydase
IE	Immediate early
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
iHDAC	Inhibiteur des histones desacétylase
IL	Interleukine
IR	Internal repeat
JAK	Janus Kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinases
kb	kilobase
KSHV	Kaposi sarcoma herpes virus
LB	Lymphome de Burkitt
LBDGC	Lymphome B diffus à grandes cellules
LBs	Lymphome de Burkitt sporadique
LBv	Lymphome de Burkitt associé au VIH
LCL	Lignée cellulaire lymphoblastoïde
LH	Lymphome de Hodgkin
LMP	Latent membrane protein
LNH	Lymphome Non Hodgkinien
LTR	Long terminal repeat
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
Mb	megabase
MCLR	Mannose type-C lectin receptor
MDC1	Mediator of DNA damage Checkpoint 1
ml	millilitre
mM	millimolaire
MRN	Complexe MRE11-Rad50-NBS1
NaB	Sodium butyrate
NF-KB	Nuclear factor-kappa B
NHEJ	Non homologous end joining
NK	Natural killers
NLS	Nuclear localisation signal
ng	nanogramme
nm	nanomètre
nM	nanomolaire
NOR	Nucleolar organizing region

ORF	Open reading frame
OriLyt	Origine lytique de réplication
OriP	Origine de réplication de l'ence
pb	paires de bases
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PcG	Polycomb Group
PCR	Polymerase chain reaction
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PML	Promyelocytic leukemia
Pol.II	ARN polymérase II
PTD	Peptide transduction domain
PTLD	Post transplant lymphoproliferative disease
PVVIH	Personnes vivant avec le VIH
qPCR	quantitative PCR
qRT-PCR	quantitative Retrotranscription PCR
RAG	Recombination activating genes
RBD	RNA binding domain
RGD	Arginin-Glycin-Aspartic acid domain
RNP	ribonucléoprotéine
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RSS	Recombination signal sequences
SHM	Somatic hypermutation
SIDA	syndrome de l'Immunodéficience acquise
STAT	Signal transducers and activators of transcription
SVF	Sérum de veau foetal
TA	Température ambiante
TADs	Topologically associated domains
TALENS	Transcription activator-like effector nucleases
TAR	Transactivation responsive region
TBST	Tris-buffered saline + Tween 20
TCR	T cell receptor
TGF B	Transforming growth factor
TI/RT	Transcriptase inverse
TLR9	Toll like receptor
TPA	12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate
TR	Terminal repeat
TSA	Trichostatine A
UL	Unique long
US	Unique short
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VHB	Virus de l'Hépatite B
VHC	Virus de l'Hépatite C
VIH	Virus de l'immuodéficience humaine
XCL1	X-C chemokine ligand 1

Listes des figures

Figure 1: Structure tridimensionnelle du noyau et les différents domaines nucléaires.....	23
Figure 2: Représentation schématique de l'organisation hiérarchique de la chromatine.....	27
Figure 3: Les différents types de boucles chromatinienne.....	29
Figure 4: Représentation schématique d'une section d'image de 3D-FISH de l'ensemble des territoires chromosomiques d'un noyau de fibroblaste humain en phase G0.....	30
Figure 5: Types de translocations chromosomiques et leurs conséquences	36
Figure 6: Recombinaison V(D)J et Séquences des signaux de recombinaison (RSS) au niveau du locus IGH.....	39
Figure 7: Mécanismes de survenue des mutations et CDBs d'ADN médiées par l'AID au cours des processus de SHM et CSR	41
Figure 8: Schéma simplifié de la voie de signalisation ATM au cours de la DDR en réponse à des CDBs.....	44
Figure 9: Les différentes voies de jonction non homologues des cassures double brins d'ADN : NHEJ classique et alternative	45
Figure 10: Enzymes impliquées dans la modification des bouts de cassure d'ADN avant la ligation au cours de la cNHEJ.....	47
Figure 11: Proximité spatiale des chromosomes et fréquence des translocation chromosomique.....	49
Figure 12: Mécanismes de la proximité spatiale entre deux loci dans la formation des translocations : modèles du "contact-first" et "breakage-first".....	51
Figure 13 : Schéma représentatif de la structure du virus EBV	65
Figure 14: Organisation du génome d'EBV.....	67
Figure 15: Caractéristiques des cellules tumorales	79
Figure 16: Potentiels effets oncogéniques des protéines de latence du virus EBV.....	84
Figure 17: Structure générale du VIH-1	115
Figure 18: Organisation du génome du VIH-1	116
Figure 19: Cycle de vie du VIH-1	118
Figure 20: Structure et organisation fonctionnelle de la protéine Tat du VIH-1.	119
Figure 21: Potentiels effets oncogéniques du VIH-1 et de ses protéines.....	128

Figure 22: Position des points de cassure de <i>MYC</i> , <i>IGH</i> , <i>IGK</i> et <i>IGL</i> au cours des Lymphomes de Burkitt endémique, sporadique et associé au VIH	133
Figure 23: Résumé des effets biologiques oncogéniques de la surexpression de <i>MYC</i>	137
Figure 24: Modèles proposés pour la pathogenèse des LB EBV positifs et négatifs.	140
Figure 25: Séparation des PBMC par gradient de centrifugation au Ficoll	151
Figure 26: Isolation des cellules B par sélection négative par séparation immuno-magnétique	152
Figure 27: Modèle expérimental de création des lignées cellulaires stables en utilisant la technologie CRISPR/Cas9	154
Figure 28: Profil sérologique EBV en fonction du stade de l'infection.....	168
Figure 29: Ceinture africaine du lymphome: Zone géographique de distribution du Lymphome de Burkitt Endémique	206
Figure 30: Colocalisation <i>MYC-IGH</i> dans les lymphocytes B circulants des enfants vivant en zone d'endémie.	210
Figure 31: Images représentative d'un marquage du génome EBV dans les cellules	211
Figure 32: Modèle proposé pour les LB EBV positifs.....	232
Figure 33: Modèle alternatif pour les LB sporadiques et associés au VIH.....	233

Liste des tableaux

Tableau I: Classification des Herpèsvirus	64
Tableau II: Protéines de Latence du virus EBV et leurs fonctions.....	68
Tableau III: Quelques protéines du cycle lytique et leur fonction.....	69
Tableau IV: Fréquence des différentes souches d'EBV selon les pays	76
Tableau V: Pathologies bénignes associées au virus EBV	77
Tableau VI: Pathologies associées au VIH	123
Tableau VII: Séquences des ARN guides utilisés pour la création des lignées cellulaires	155
Tableau VIII: Caractéristiques des substances utilisées pour le traitement des cellules	156
Tableau IX: Liste de la séquence des amorces utilisés pour la PCR et la RT-PCR	160
Tableau X: Caractéristiques épidémiologiques et paramètres biologiques des 13 PVVIH	166
Tableau XII: Profil épidémiologique, clinique et sérologie EBV des enfants.....	208

Introduction générale

Le lymphome de Burkitt (LB) est un Lymphome Non Hodgkinien (LNH) de type B hautement agressif pour lequel trois entités cliniques sont décrites : sporadique (LBs), associée au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (LBv) et endémique (LBe). En occident, on retrouve les LBs et LBv qui sont associés au virus Epstein-Barr (EBV) respectivement dans 10 à 20% et 40 à 50% des cas (Allday, 2009; Germini et al., 2020). Le LBe est essentiellement retrouvée en Afrique subsaharienne. Elle touche les enfants âgés entre 2 et 15 ans et est systématiquement associé à EBV (Bornkamm, 2009; Brady et al., 2007; Mawson and Majumdar, 2017a; Moormann and Bailey, 2016). Dans les zones endémiques, en plus d'EBV divers cofacteurs comme le *Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*), le latex de la plante *Euphorbia tirucalli* (*E. tirucalli*) et potentiellement l'aflatoxine B1 (AFB1) sont impliqués dans la pathogenèse du LBe. Ces cofacteurs partagent en commun d'une part une répartition géographique superposable à celle du LBe, et d'autre part, la capacité de réactiver EBV dans les lymphocytes B infectés de façon latente (Accardi et al., 2015; Mannucci et al., 2012a; Torgbor et al., 2014).

Le développement du LB semble ainsi étroitement lié à ces deux virus EBV et VIH. Le LB est en effet 30 à 50 fois plus fréquent chez les personnes vivant avec le VIH (PVVIH) comparé à la population générale (Gibson et al., 2014). En zone d'endémie, la probabilité de développer un LB est 13 fois plus élevée chez les enfants coinfectés par EBV et le *Plasmodium falciparum* (Musalima et al., 2008). Cependant, les mécanismes par lesquels ces deux virus si différents, – EBV étant un virus à ADN infectant essentiellement les lymphocytes B et le VIH un virus à ARN infectant en majorité les lymphocytes T – sont impliqués dans la pathogenèse du LB ne sont pas encore totalement élucidés.

Au niveau moléculaire, le LB est caractérisé, quelle que soit la forme clinique, par une translocation chromosomique impliquant l'oncogène *MYC* situé sur le chromosome 8 et l'un des gènes des chaînes d'immunoglobuline *IGK*, *IGH* ou *IGL* situés respectivement sur les chromosomes 2, 14 et 22. La plus fréquente est la translocation t(8 ;14), retrouvée dans près de 80% des cas (Allday, 2009; Ribrag and Bosq, 2013; Torgbor et al., 2014). De plus en plus d'études mettent la lumière sur les mécanismes de lymphomagenèse induits par EBV et VIH. Mais, la question de leur implication directe dans les mécanismes de formation de cette translocation chromosomique caractéristique du LB reste encore peu abordée.

Mes travaux de thèse ont été axés sur l'investigation du rôle joué par ces deux virus dans la formation de la plus fréquente des translocations du LB, présente dans 80% des cas : la t(8 ;14) impliquant *MYC* et *IGH*.

La première partie de cette thèse a été dédiée à la revue bibliographique. Nous y avons d'abord abordé dans le premier chapitre, le noyau des cellules eucaryotes d'une façon générale, sa structure, ses composantes et l'organisation de l'architecture nucléaire. Ce qui nous a permis d'introduire dans un deuxième chapitre, les translocations chromosomiques et leur mécanisme de formation en insistant sur la translocation t(8 ;14). A la fin de ce deuxième chapitre, nous avons présenté notre revue sur les rôles joués par les virus EBV et VIH dans le remodelage du noyau des lymphocytes B potentiellement à la base de la formation des translocations chromosomiques. Ensuite, nous avons traité les virus EBV et VIH respectivement dans le troisième et quatrième chapitre de la revue bibliographique, abordant leur structure, propriétés biologiques, et propriétés oncogéniques. Une deuxième revue à laquelle nous avons contribué et qui porte sur les propriétés oncogéniques de la protéine Zebra du virus EBV a été présentée à la fin du chapitre portant sur EBV. Nous avons enfin clos cette partie par une mise au point sur le LB et l'implication des virus EBV et VIH dans sa pathogenèse.

A la suite de la revue de la littérature qui a mis en évidence l'absence de données suffisantes sur un rôle spécifique de ces deux virus dans la formation de la t(8 ;14) du LB, nous avons énoncé nos questions de recherches, les hypothèses évoquées, ainsi que les objectifs de ce travail. Ensuite, la méthodologie utilisée pour atteindre ces objectifs a été présentée suivis des résultats obtenus. Les résultats ayant fait l'objet d'une publication ou d'un article en cours de soumission ont été présentés sous le format de l'article. Une discussion globale des résultats présentés dans ce travail a été proposée avant de conclure et de dégager des perspectives de recherches.

La liste des publications obtenues durant ces quatre années de thèse, de même que celle des communications orales ou affichées présentés lors de divers congrès scientifiques sont présentées en annexes 1-3. En plus de mon projet de thèse, j'ai également travaillé sur un autre projet de l'équipe portant les lymphomes du manteau qui a fait l'objet d'un « preprint » présenté en annexe 4.

Revue de la littérature

1. Noyau des cellules eucaryotes et organisation de l'architecture nucléaire

Dans cette partie, nous allons d'abord aborder, la structure et les composants du noyau suivi de l'organisation de l'architecture nucléaire des cellules eucaryotes et terminer par les facteurs déterminant cette organisation nucléaire. Ces rappels nous permettront de mieux envisager le rôle joué par les virus EBV et VIH dans le remodelage de l'architecture nucléaire pouvant aboutir potentiellement à la formation de la translocation t(8 ;14).

1.1.	Structure et contenu du noyau	-----	23
1.2.	Organisation de l'architecture nucléaire	-----	26
1.3.	Facteurs déterminants la répartition des chromosomes dans l'espace nucléaire	-----	31

1.1. Structure et contenu du noyau

Le noyau est une importante structure cellulaire présente dans la majorité des cellules eucaryotes et dont le principal rôle est de stocker le matériel génétique de la cellule ainsi que les éléments nécessaires à la régulation de l'expression des gènes et à la réplication des chromosomes. Le noyau a un diamètre d'environ 5 à 6µm et est composé de diverses structures bien individualisées aux fonctions plus ou moins connues (Figure 1).

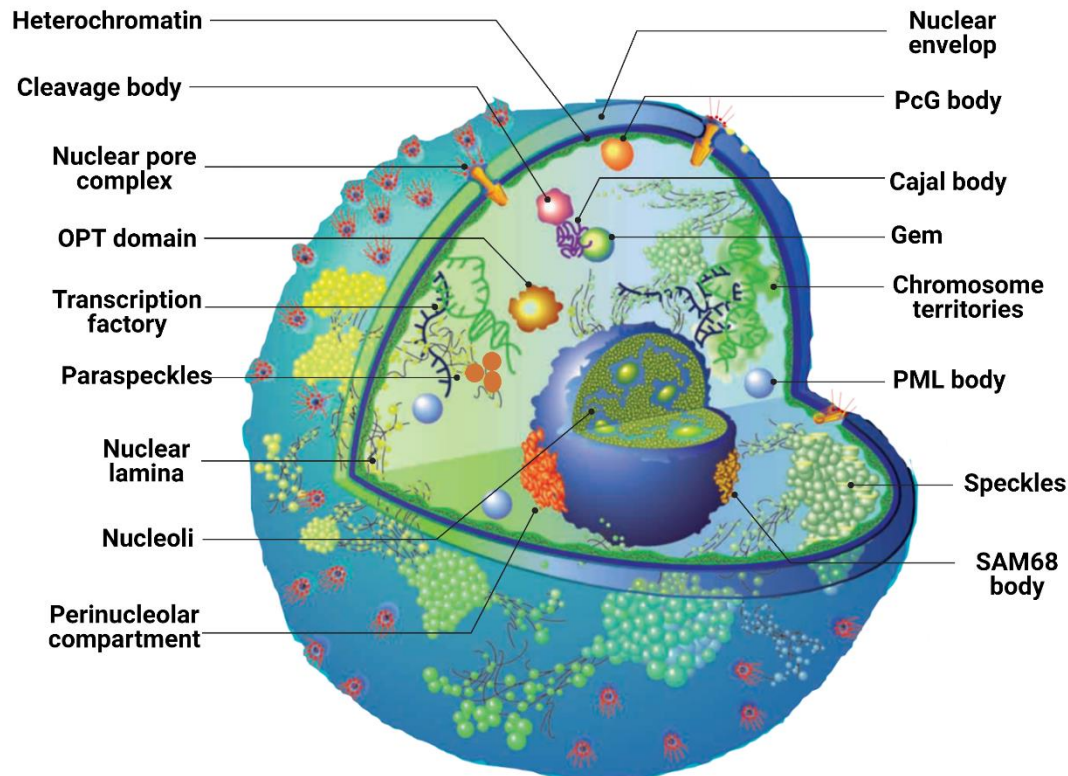


Figure 1: Structure tridimensionnelle du noyau et les différents domaines nucléaires.

Modifié et adapté de (Spector, 2001)

⇒ **L'enveloppe nucléaire** entoure le noyau et le sépare du cytoplasme. Elle est constituée de deux membranes internes et externes délimitant l'espace périnucléaire. La membrane interne est recouverte par la **lamina nucléaire**, un réseau de protéines (les lamines A, B, C et les protéines associées aux lamines) qui jouent un rôle de soutien. La membrane externe est en continuité avec le réticulum endoplasmique granuleux. Les deux membranes internes et externes fusionnent par endroit formant des **pores nucléaires** qui assurent les échanges nucléo-cytoplasmiques dans les deux sens. Au-delà de leur rôle de délimitation physique,

ces structures ont également un rôle important dans la compaction de la chromatine et dans la régulation de l'expression des gènes.

⇒ **La chromatine** est constituée par l'ADN associé à des protéines histones et non histones et baigne dans un suc nucléaire appelé **nucléoplasme**. Elle apparaît sous forme diffuse pendant l'interphase et se condense sous forme de chromosomes pendant la mitose. Deux types de chromatine existent :

- o **L'euchromatine** est la forme la moins compacte de l'ADN et est généralement située au centre du noyau. Elle apparaît peu dense et peu visible au microscope électronique. Les séquences d'ADN qui la compose contiennent des gènes en général actifs dans la cellule.
- o **L'hétérochromatine** située en périphérie du noyau est plus dense, apparaît sombre en microscopie électronique et est transcriptionnellement inactive. On distingue l'hétérochromatine facultative constituée de régions géniques non exprimées dans la cellule et l'hétérochromatine constitutive des centrosomes ou télomères qui reste compacte indépendamment du cycle cellulaire, du stade de développement ou du type cellulaire.

⇒ **Le nucléole** est le premier corps nucléaire identifié et est essentiel à la synthèse des ARN ribosomales (ARNr) et l'assemblage des ribosomes. Le nucléole abrite en son sein les régions chromosomiques portant les gènes qui codent pour les précurseurs des ARNr. Ces régions chromosomiques s'organisent en régions appelées Régions Organisatrices du nucléole ou NOR (*Nucleolus Organizing Regions*). Des protéines particulières appelées AgNOR (du fait de leur sensibilité à la coloration à l'argent), telles que la nucléoline et la nucléophosmine, sont localisées au niveau de ces NOR et permettent de les mettre en évidence facilement. En plus des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes, le nucléole renferme de nombreuses autres protéines intervenant dans divers processus cellulaires tels que la réplication et réparation de l'ADN, le maintien de la stabilité génomique, l'organisation chromatinienne, l'épissage des ARNm ou encore le cycle cellulaire (Andersen et al., 2005). De nombreuses études ont exploré les relations entre une dérégulation des fonctions nucléolaires et le développement de cancers (revue dans (Orsolic et al., 2016)). Par ailleurs, beaucoup de virus tel que le VIH, détournent les protéines et fonctions nucléolaires pour

faciliter la traduction ou l'export des ARNm viraux (Arizala and Rossi, 2011; Arizala et al., 2018; Jarboui et al., 2012).

⇒ **Autres domaines nucléaires**

- o **Les usines de transcription**, (TFs = *transcription factories*) encore appelées centres de transcription, ont été décrites pour la première fois par Jackson et ses collègues qui ont mis en évidence, grâce à l'incorporation de bromodésoxyuridine (BrdU) dans le noyau de cellules HeLa, des sites spécifiques où se déroule la transcription (Jackson et al., 1993). Ces usines de transcription correspondent à une accumulation de molécules d'ARN polymérase dont le nombre peut varier de 4 à 30 par usine (Rieder et al., 2012). Le nombre d'usines de transcription peut varier de quelques centaines à quelques milliers par cellule, si bien que plusieurs gènes actifs peuvent partager la même usine pour être transcrits. Ceci a été démontré par exemple pour *MYC* et *IGH* normalement situés dans des compartiments nucléaires différents mais qui peuvent partager la même usine de transcription des certaines circonstances telles que dans les lymphocytes B murins stimulés (Osborne et al., 2007) ou dans des cellules B humaines traitées par la protéine Tat du VIH1 (Germini et al., 2017).
- o **Les corps PML** (*Promyelocytic Leukemia nuclear bodies*), décrits pour la première fois par microscopie électronique en 1960 (de Thé et al., 1960) sont des corps protéiques ne contenant généralement pas d'ADN ni d'ARN (Boisvert et al., 2000). Les protéines PML sont les constituants majeurs de ces corps qui sont impliqués dans diverses fonctions cellulaires telles que la régulation transcriptionnelle, la réponse aux dommages d'ADN, l'apoptose, la senescence et l'angiogenèse (revue dans (Bernardi and Pandolfi, 2007)). Les PML sont également connus pour leurs propriétés antivirales (Lallemand-Breitenbach and de Thé, 2010) et de nombreux virus tels que EBV peuvent induire leur dégradation (Sivachandran et al., 2012).
- o **Les corps d'épissage ou « speckles »** regroupent les constituants de la machinerie d'épissage des ARN pré-messagers (pré-ARNm) qui ont une distribution caractéristique en tâche ou « speckles », chaque speckle définissant un domaine nucléaire appelé domaine SC35. Ils jouent un rôle majeur dans la transcription et le métabolisme des ARNm

- o **Les corps de Cajal** sont des corps nucléaires impliqués dans la biogénèse de nombreuses classes de ribonucléoprotéines (RNPs) en particulier la maturation de petites particules nucléaires ribonucléoprotéiques appelées snRNP (*small nuclear RNP*) qui constituent le spliceosome. Ils ne sont cependant pas présents dans toutes les cellules et ont été décrits chez l'homme dans les cellules embryonnaires, fœtales, nerveuses mais également dans des cellules cancéreuses (Hearst et al., 2009; Sawyer et al., 2016).
- o **Les corps Polycombs** ou PcG (*Polycomb Group*) identifiés pour la première fois chez *Drosophila melanogaster*, sont un groupe de protéines qui jouent un rôle essentiel dans la régulation transcriptionnelle et dans le maintien de l'architecture de la chromatine (Aranda et al., 2015; Simon, 2003)
- o **D'autres domaines nucléaires** tels que les corps OPT, les paraspeckles, les corps SAM68, les corps de clivages et le compartiment périnucléolaire ont également été décrits (revue dans (Spector, 2001)).

1.2. Organisation de l'architecture nucléaire

Environ 2m d'ADN sont empaquetés et compactés dans un noyau de l'ordre de quelques micromètres de diamètre au sein de la chromatine, laquelle se condense en chromosome en début de mitose. Il existe différents niveaux hiérarchiques de compaction qui définissent une architecture nucléaire à la fois structurelle et fonctionnelle, impliquée dans des fonctions biologiques essentielles telles que la transcription, la réparation de l'ADN et sa réplication. Plusieurs techniques de microscopie électronique, de diffusion de rayons X en passant par la ChromEMT ont permis d'identifier les principes du repliement de la chromatine au sein du noyau en partant de l'échelle du nucléosome. Des techniques telles que l'hybridation In Situ par Fluorescence (FISH) ou les techniques de la famille 3C (Chromatin Conformation Capture) permettent aujourd'hui de mettre en évidence des contacts physiques au sein de la chromatine en partant de l'échelle chromosomique pour gagner en résolution jusqu'à une échelle d'interaction entre des loci spécifiques. Ces techniques ont permis de mieux caractériser l'organisation hiérarchique de la chromatine (Figure 3) avec la mise en évidence de l'existence de territoires chromosomiques, de compartiments chromatinien et de domaines chromatinien.

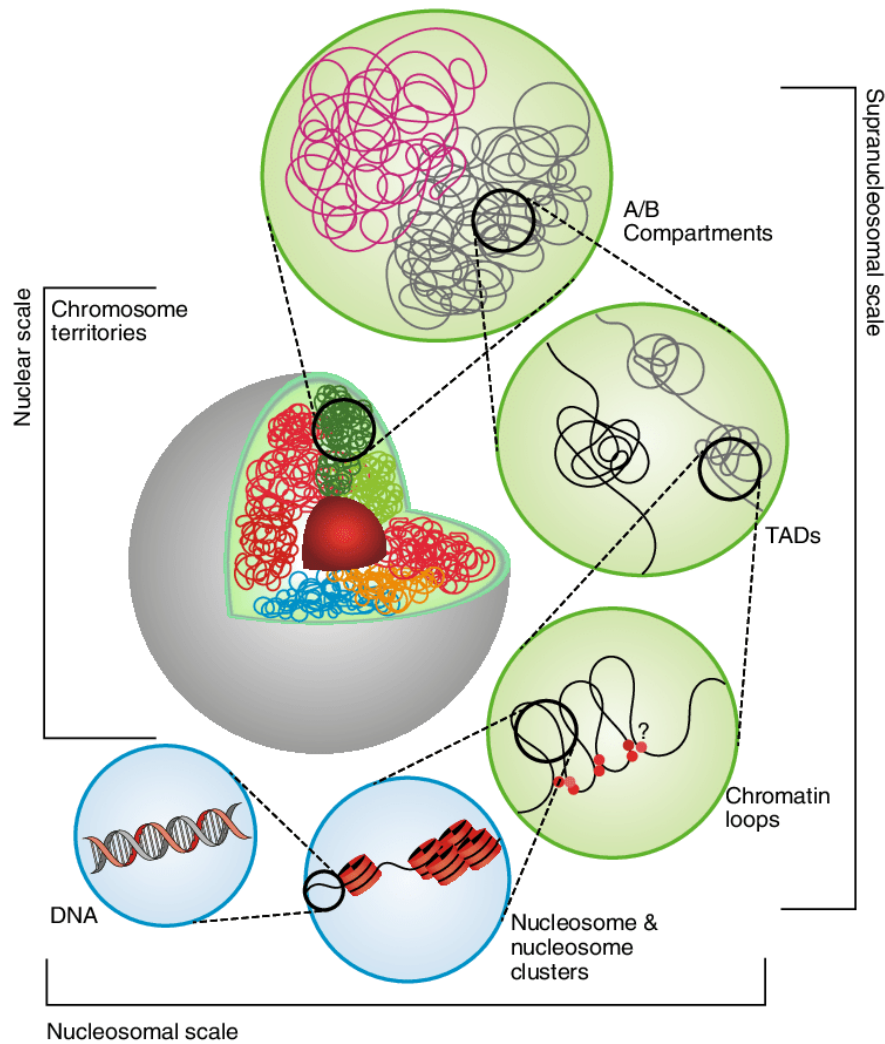


Figure 2: Représentation schématique de l'organisation hiérarchique de la chromatine.

Environs 146pdb d'ADN s'enroulent autour d'un octamère d'histone pour former les nucléosomes qui s'enchaînent formant le nucléofilament. A l'échelle supranucléosomale, la chromatine est organisée en boucles géantes (chromatin loops) qui définissent des domaines d'interaction physiques : les domaines topologiquement associés (TADs). Ces derniers s'organisent en compartiments et à l'échelle chromosomique, la fusion des compartiments au sein d'un chromosome définit les territoires chromosomiques. Selon (Doğan and Liu, 2018).

⇒ **Le nucléofilament**

L'unité structurale de base de la chromatine est le nucléosome, premier niveau d'organisation de la chromatine. Il est constitué d'un segment d'ADN d'environ 146 paires de bases (pdb), enroulé autour d'un disque protéique représenté par un octamère d'histone constitué de deux dimères H3-H4 et H2A-H2B. Les nucléosomes s'enchaînent sur l'ADN à l'échelle de dizaines de pdb formant le nucléofilament ou fibre de 10nm ou « collier de perle » (Luger et al., 1997). La fibre de 10nm correspond à la forme la plus décompactée de la chromatine et les nucléosomes y sont séparés par des segments d'ADN de liaison dont la longueur varie de 1 à 80nm. L'histone H1 se lie à un fragment variable de l'ADN de liaison et forme avec le nucléosome un complexe

appelé chromatosome. Des modifications post-traductionnelles de ces histones (méthylation, acétylation, phosphorylation, ubiquitination, glycosylation, sumoylation...) peuvent cibler différents résidus (Lysine K, Arginine R, Sérine S...) et modifier la compaction de la chromatine et/ou interférer avec des fonctions biologiques (transcription, réparation ou réplication de l'ADN) (Felsenfeld and Groudine, 2003; Portela and Esteller, 2010). Ces modifications sont qualifiées d'épigénétique. Une caractérisation de ces modifications chimiques des histones a conduit à proposer un modèle de « code d'histone » dans lequel chaque modification est associée à un état transcriptionnel (activation ou répression) (Strahl and Allis, 2000). De plus, l'ADN en lui-même peut subir des modifications à type de méthylation au niveau du carbone 5 des cytosines (C) précédant une guanine (G) (dinucléotides CpG). Une méthylation du promoteur d'un gène est associée à une répression transcriptionnelle par encombrement stérique ou par coopération avec d'autres voies de répression transcriptionnelle (Sasai and Defossez, 2009; Watt and Molloy, 1988).

⇒ **Boucles chromatinien**

A une échelle plus grande, l'organisation de la chromatine repose sur la formation de boucles géantes appelées « *loop* ». Plusieurs types de boucles chromatinien sont décrites (Figure 3), chacun ayant un rôle différent dans l'expression des gènes : i) boucles « enhancer-promoter » qui permettent le contact entre le promoteur d'un gène et ses régions régulatrices ; ii) boucles intra géniques qui permettent de recycler l'ARN-polymérase II (Pol.II) et sont supposées faciliter le maintien de la direction de la transcription ; iii) boucles médiées par les protéines Polycomb qui seraient associées à une inhibition de la transcription ; iv) boucles architecturales médiées par des protéines « isolatrices » (*insulator proteins*) telle que CTCF (CCCTC-binding factor). Ces boucles chromatinien sont établies ou stabilisées par des contacts protéines-protéines impliquant les protéines architecturales (voir plus loin) et /ou les structures régulatrices telles que les usines de transcription et les corps PcG (Bonev and Cavalli, 2016).

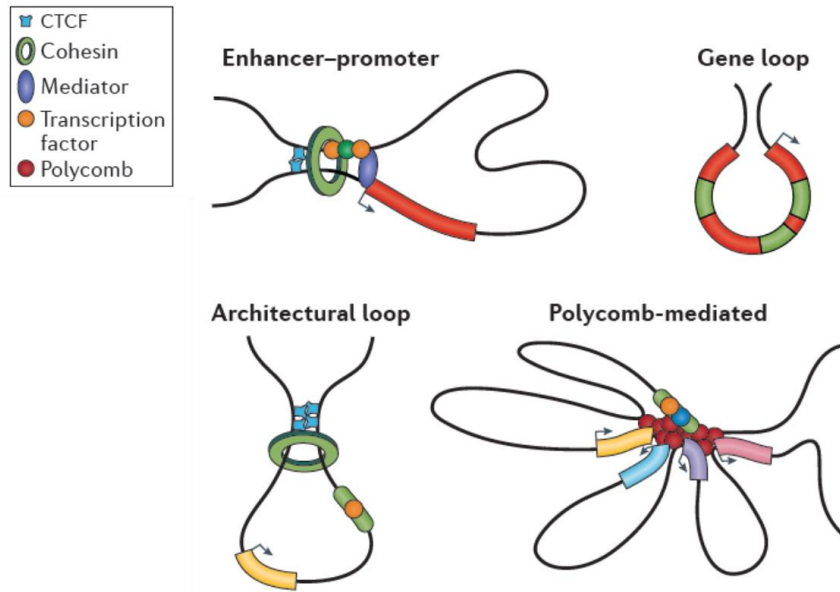


Figure 3: Les différents types de boucles chromatinienne

Les boucles « enhancer-promoter » (en haut à gauche) assure le contact entre les régions régulatrices d'un gène et son promoteur. Les « gene loop » ou boucles intragéniques (en haut à droite) assurent le recyclage de l'ARN polymérase II et le maintien de la direction de la transcription. Les boucles architecturales (en bas à gauche) sont médiées par les protéines isolatrices telles que CTCF. Les boucles médiées par les corps Polycomb (en bas à droite) sont associées à une inhibition de la transcription. Selon (Bonev and Cavalli, 2016).

⇒ **Domaines chromatinien**

Les boucles chromatinienne définissent des domaines d'interaction physique de l'ADN appelés Domaines topologiquement associés ou TADs (« *Topologically Associated Domains* ») qui sont de l'ordre de la mégabase (Mb). Chaque chromosome est compartimenté en de multiples TADs. Les interactions physiques de l'ADN sont fréquentes au sein des régions génomiques appartenant au même TAD alors que celles appartenant à des TADs différents interagissent très rarement (Dixon et al., 2012). Ces TADs peuvent rester stables lors des divisions cellulaires et sont très conservés entre différents types cellulaires et entre différentes espèces au cours de l'évolution. La répartition spatiale du génome en TADs est corrélée avec plusieurs caractéristiques fonctionnelles telles que les modifications d'histones, l'expression des gènes, l'association à la lamine nucléaire ou le temps de réplication de l'ADN (Bonev and Cavalli, 2016; Dixon et al., 2012).

⇒ **Compartiments chromatinien**

Plusieurs TADs s'organisent en compartiments et les régions intra ou interchromosomiques appartenant au même compartiment vont interagir préférentiellement. Le génome est ainsi

subdivisé en deux compartiments arbitrairement dénommés A et B, le premier étant constitué de régions chromatinienne actives (euchromatine, usines de transcription, corps d'épissage, corps PML...) tandis que le second regroupe les compartiments inactifs (hétérochromatine, lamine nucléaire, corps PcG, périphérie du nucléole...) (Lieberman-Aiden et al., 2009). Contrairement aux TADs, les compartiments chromatinien A et B ne sont pas conservés entre les types cellulaires. En effet, les TADs qui constituent les compartiments peuvent passer d'un état inactif à un état actif, basculant ainsi d'un compartiment à un autre.

⇒ ***Territoires chromosomiques***

La fusion des compartiments au sein d'un chromosome définit les territoires chromosomiques ou CTs (*Chromosome Territories*). Ce sont des expériences de FISH qui ont permis de confirmer l'existence des CTs (Bolzer et al., 2005; Lichter et al., 1988) montrant que chaque chromosome occupe un territoire chevauchant relativement peu avec celui du chromosome voisin (Figure 4). Il est important de noter que ces CTs ne sont pas répartis de façon aléatoire dans l'espace nucléaire et sont variables d'un type cellulaire à un autre (nous y reviendrons).

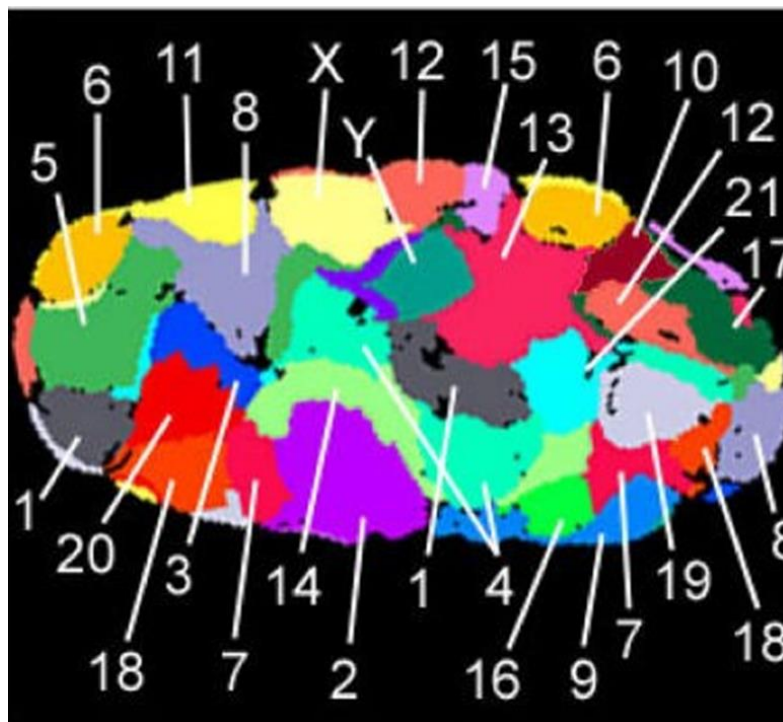


Figure 4: Représentation schématique des territoires chromosomiques

Une section d'image de 3D-FISH de l'ensemble des territoires chromosomiques d'un noyau de fibroblaste humain en phase G0 est représentée. Chaque territoire chromosomique est indiqué avec une couleur différente et les numéros des chromosomes sont indiqués. Selon (Bolzer et al., 2005).

⇒ ***Les protéines architecturales :***

La formation des boucles chromatinienne ainsi que le maintien des frontières entre les TADs et entre les CTs sont assurés par les protéines architecturales CTCF et cohésines. CTCF ou 11-zinc finger protein est un facteur de transcription dont le rôle principal est la régulation de la structure tridimensionnelle de la chromatine (Phillips and Corces, 2009). Le complexe cohésine est composée de plusieurs sous-unités (entre autres Smc1, Smc3, Rad21 et SA1/2) qui forment un anneau protéique. Les cohésines permettent le maintien des deux chromatides sœurs associées mais joueraient également un important rôle dans la régulation transcriptionnelle (Liu et al., 2009). CTCF et cohésines sont retrouvées aux jonctions des différents domaines chromatinien et participent ainsi à l'organisation structurale et fonctionnelle de l'architecture nucléaire.

1.3. Facteurs déterminants la répartition des chromosomes dans l'espace nucléaire

⇒ ***Positionnement radial des CTs***

Comme précédemment énoncé, les constituants du noyau tendent à s'organiser de façon non aléatoire, les CTs occupant des positions radiales préférentielles dans le noyau en fonction de plusieurs facteurs. Il est admis que la taille et la densité en gène des chromosomes influencent leur positionnement dans l'espace nucléaire. En effet, en général, les chromosomes de petite taille et riches en gènes occupent une position plus centrale comparés aux chromosomes de grande taille et pauvres en gènes (Cavalli and Misteli, 2013; Chen et al., 2017; Parada and Misteli, 2002). Le positionnement radial des CTs est également cellules et tissus spécifique (Parada et al., 2004). A titre d'exemple, dans les lymphocytes humains, le chromosome 19 riche en gène est situé au centre du noyau comparé au chromosome 18 de même taille environ, mais trois fois plus pauvre en gène (Cremer et al., 2003). Cependant, cette même répartition des chromosomes 18 et 19 n'a pas été retrouvée dans des fibroblastes (Bolzer et al., 2005; Zeitz et al., 2009). Chez la souris, le chromosome 5 occupe une position interne dans les cellules hépatiques et périphérique dans les cellules pulmonaires (Parada et al., 2004). Selon Zuleger et al., ces différences pourraient être expliquées au moins en partie par le niveau d'expression de certaines protéines de la membrane nucléaire interne qui en se liant à la lamina pourraient entraîner une relocalisation des CTs vers l'intérieur ou vers la périphérie (Zuleger et al., 2013). Certaines conditions physiopathologiques en rapport avec le cycle cellulaire ou le stress peuvent

également influencer sur la répartition des CTs. Mehta et ses collaborateurs ont mis en évidence une redistribution des CTs 15mn après déprivation de sérum dans des fibroblastes humains en culture selon un mécanisme actif (Mehta et al., 2010) qui serait dépendant de la lamina nucléaire (Mehta et al., 2011). Une relocalisation des CTs a également été décrit en réponse à des dommages d'ADN et serait réversible après réparation des dommages (Fatakia et al., 2017; Kulashreshtha et al., 2016; Mehta et al., 2013).

⇒ **Positionnement radial des gènes**

Comme pour les CTs, on observe une répartition spécifique et non aléatoire des loci, également variable d'un type cellulaire à un autre. La répartition préférentielle des gènes serait corrélée à leur activité transcriptionnelle : les gènes actifs occuperaient une position centrale et ceux inactifs une position plus périphérique. Dans les progéniteurs lymphoïdes, *IGH* est inactif et occupe une position périphérique contrairement aux précurseurs lymphoïdes où il est central (Kosak et al., 2002). L'activité transcriptionnelle d'un gène et donc sa position radiale peut varier au cours de divers processus biologiques telles que la différenciation, la réplication ou la réparation de l'ADN. Le locus *DPPA2* chez la souris est exprimé dans les cellules souches où il occupe une position centrale alors qu'il est périphérique dans les cellules différenciées où il est inactif (Hiratani et al., 2010). De même, les loci *βglobine* dans les cellules érythroïdes et *GATA3* dans les cellules T murines passent d'une position périphérique à une position centrale au cours de la différenciation (Hewitt et al., 2004; Ragoczy et al., 2006; Takizawa et al., 2008).

Cependant, il semblerait que c'est l'activité transcriptionnelle qui détermine la position radiale d'un loci et non le contraire (Zink et al., 2004). En présence de signaux spécifiques, des loci peuvent sortir de leurs CTs et se localiser dans l'espace interchromosomique enrichi en machinerie de régulation de l'expression génique (Geyer et al., 2011). Ainsi, le positionnement périphérique d'un gène peut être le reflet de l'association de ce locus avec des structures nucléaires périphériques telles que la lamina qui induit un état chromatinien répressif (Geyer et al., 2011; Reddy et al., 2008). Parallèlement, le positionnement central d'un loci pourrait résulter d'une association à des compartiments internes du noyau : d'une part les usines de transcription, speckles ou corps PML qui sont transcriptionnellement actifs (Schoenfelder et al., 2010; Wang et al., 2004) ; d'autre part les corps PcG ou la périphérie du nucléole qui peuvent être associés à un environnement répressif. Il apparaît alors qu'une position centrale d'un loci n'est pas toujours corrélée à un état transcriptionnel actif. Les zones transcriptionnellement actives du noyau

comme les usines de transcription ne sont pas limitées au centre mais sont réparties de façon uniforme dans le noyau, même si dans certaines cellules, des zones internes préférentielles pour la transcription pourraient exister pour certains gènes. De la même façon, l'hétérochromatine qui est transcriptionnellement silencieuse n'est pas limitée à la périphérie du noyau (Takizawa et al., 2008).

Pour résumer ce chapitre, nous pouvons retenir que les chromosomes et les gènes occupent des positions préférentielles dans l'espace nucléaire. Ces positions varient en fonction du tissu et des types cellulaires. L'architecture nucléaire est perturbée au cours de processus physiologiques tels que la différenciation, la transcription, la réplication ou la réparation de l'ADN. Le repositionnement des chromosomes et des loci peut également survenir au cours de processus pathologiques comme les cancers ou les infections virales. En effet, en tant que pathogènes intracellulaires obligatoires, les virus explorent différentes structures cellulaires, en particulier le noyau, pour assurer leur survie. Par interaction du génome viral ou de ses protéines avec les structures nucléaires, on assiste en général à une restructuration de la chromatine en réponse à une infection virale (revue dans (J de Castro and Lusic, 2019)). Nous verrons dans le chapitre suivant qu'un remodelage de l'architecture nucléaire induit par ses facteurs peut jouer un rôle déterminant la survenue de translocations chromosomiques spécifiques.

2. Mécanismes des translocations chromosomiques

Dans ce chapitre, nous allons, après avoir défini la notion de translocation chromosomique, aborder les mécanismes de formation des translocations chromosomiques en axant nos propos sur les trois conditions supposées nécessaires pour qu'une translocation chromosomique se forme :

- Des cassures double brins (CDBs) simultanées sur les deux chromosomes partenaires
- Une réparation aberrante de ces CDBs par un processus de réparation non homologue ou NHEJ (*Non-Homologous End Joining*)
- Une proximité spatiale des segments d'ADN impliqués dans la translocation

2.1. Définition	35
2.2. Cassures double brin d'ADN	36
2.2.1. CDBs initiées par les RAG dans les lymphocytes B	37
2.2.2. CDBs initiées par AID dans les lymphocytes B	40
2.2.3. Autres sources de CDBs d'ADN	41
2.3. Réponse aux CDBs et réparation de l'ADN	42
2.3.1. La réponse aux CDBs d'ADN (DDR)	43
2.3.2. La Réparation Non-Homologue des CDBs (NHEJ)	45
2.3.2.1. Mécanismes de réparation par cNHEJ	46
2.3.2.2. Mécanismes de réparation par aNHEJ	47
2.4. Proximité spatiale entre les deux loci	48
2.4.1. Arguments en faveur de la corrélation entre proximité spatiale et fréquence de translocation	48
2.4.2. Mécanismes cellulaires d'induction de la proximité spatiale	50
2.5. Article 1 : Revue « Effects of environmental factors on nuclear organization and transformation of human B lymphocytes »	52

2.1. Définition

Une translocation chromosomique est un échange de matériel génétique entre deux ou plusieurs chromosomes. On parle de translocation robertsonienne lorsqu'il y a cassure et fusion des bras longs de deux chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) avec perte des bras courts (Figure 5A). En revanche, dans les translocations réciproques, il y a échange de matériel génétique entre deux chromosomes non homologues ; ces translocations sont qualifiées d'équilibrées lorsqu'il n'y a ni perte, ni gain de matériel génétique (Figure 5B). Au niveau moléculaire, les translocations réciproques peuvent avoir trois conséquences (Figure 5C): i) une dérégulation de l'expression d'un gène lorsque le cadre de lecture d'un gène est juxtaposé avec le promoteur d'un autre gène : c'est le cas de *MYC* et *IGH* dans la t(8;14) du Lymphome de Burkitt; ii) une perte de fonction d'un gène lorsque la séquence de la région codante est perturbée ; iii) une fusion de deux gènes à l'origine de la production d'une protéine chimérique impliquant le plus souvent une tyrosine kinase (*BCR* et *ABL* dans la t(9;22) de la Leucémie Myéloïde Chronique) ou un facteur de transcription (*AML* et *ETO* dans la t(8;21) de la Leucémie Aigüe Myéloïde). Ces conséquences sont souvent à la base de la transformation cancéreuse des cellules. Ainsi, du fait de leurs implications dans le développement de plusieurs cancers en particulier hématologiques, les translocations chromosomiques occupent une place importante dans la recherche et les mécanismes de leur formation font l'objet de plusieurs études.

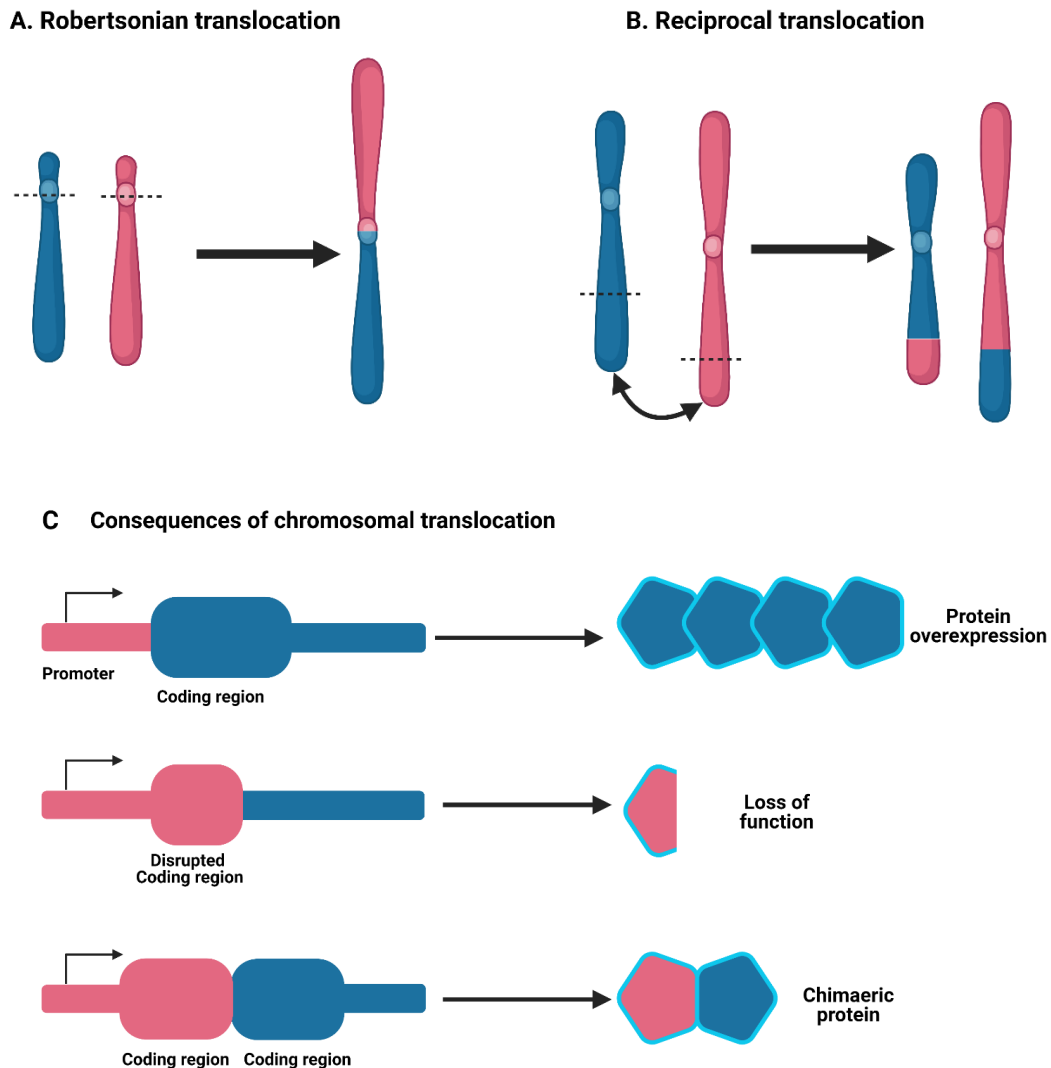


Figure 5: Types de translocations interchromosomiques et leurs conséquences

A) Translocations robertsoniennes qui aboutit à la fusion des bras longs de deux chromosomes acrocentriques avec perte des bras courts. B) Translocation réciproque. Echange réciproque de matériel génétique entre deux chromosomes non homologues. C) Conséquences d'une translocation chromosomique : surexpression d'une protéine, perte de fonction ou création d'une protéine chimérique.

2.2. Cassures double brin d'ADN

L'ADN subit en permanence des lésions, physiologiques ou pathologiques, pouvant provenir de sources endogènes ou exogènes. Ces lésions sont variables en fonction de la cause, pouvant aller d'une cassure simple brin aux cassures double brins (CDBs) en passant par des liaisons intra ou inter brins, adduits ADN-protéines, mésappariement ou déamination de bases, oxydation de l'ADN... (revue dans (Chatterjee and Walker, 2017)). Ces lésions, si non ou mal réparées, sont source d'instabilité génomique qui constitue un paramètre clé de la transformation cancéreuse.

Nous aborderons uniquement les dommages d'ADN à type de CDBs puisque ce sont ceux impliqués dans la formation des translocations chromosomiques. Toutefois, il est important de noter que, tout défaut de réparation des autres types de lésions de l'ADN sus-citées peut aboutir à la formation de CDBs (Bohlander and Kakadia, 2015).

L'apparition de ces CDBs peut relever de mécanismes physiologiques ou pathologiques. Les mécanismes physiologiques sont constitués par les CDBs programmées soit dans les cellules méiotiques, soit dans les lymphocytes B ou T au cours d'étapes précises de leur développement et maturation. A l'opposé, les CDBs pathologiques sont essentiellement la conséquence de facteurs endogènes ou exogènes environnementaux. Ici nous détaillerons surtout les CDBs physiologiques induits par les enzymes RAG (recombination-activating genes) 1 et 2 et AID (activation-induced deaminase) dans les lymphocytes B où elles ciblent les gènes des chaînes d'immunoglobulines (Ig). Une activité aberrante de ces enzymes peut favoriser l'introduction simultanée de CDBs en dehors de leurs cibles habituelles, promouvant ainsi l'apparition de translocations chromosomiques (Byrne et al., 2014).

2.2.1. CDBs initiées par les RAG dans les lymphocytes B

Au cours de la lymphopoïèse B, un processus de recombinaison somatique de l'ADN ou recombinaison V(D)J se déroule sur les gènes d'Ig au niveau de la moelle osseuse. Une Ig est composée de deux chaînes lourdes H identiques et de deux chaînes légères L identiques. Le gène *IGH* codant pour la chaîne lourde est localisé sur le chromosome 14 ; les gènes *IGK* et *IGL* codant pour les chaînes légères sont situés respectivement sur les chromosomes 2 et 22. Dans les progéniteurs lymphoïdes, le locus *IGH* non fonctionnel est composé : i) d'une succession de segments de gènes différents : 123 gènes V (=variables) dont 46 fonctionnels, 27 gènes D (=diversité) dont 23 fonctionnels et 9 gènes J (= jonction) dont 6 fonctionnels; ii) d'une série de 11 gènes C (=constant) dont 9 sont fonctionnels qui détermineront plus tard le type de chaîne lourde μ , δ , γ , α ou ϵ définissant respectivement les isotypes IgM, IgD, IgG, IgA et IgE. Sur les loci *IGK* et *IGL*, on retrouve la même succession sans les segments D. La recombinaison V(D)J permet de transformer les gènes d'Ig longs et non fonctionnels en des gènes plus courts et fonctionnels capable de produire des chaînes lourdes et légères, avec une grande diversité combinatoire. Les segments V-D-J du locus *IGH* ou V-J des loci *IGK* et *IGL* sont flanqués de séquences appelées RSS (*Recombination Signal Sequence*) composés de jonctions heptamères-nonamères séparées par un intervalle de 12 ou 23 nucléotides (Figure 6A). RAG1 et RAG2

forment un complexe qui reconnaît ces RSS, y introduisant des coupures simples brins, transformées en CDBs par le complexe nucléase DNA-PKcs/Artemis. Les RAG agissent selon la règle du 12-23 : un RSS avec une séquence intercalante de 12 nucléotides sera recombiné avec un RSS ayant un intercalant de 23 nucléotides. Différents RSS sont répertoriés au niveau des segment V, D et J du locus *IGH* (Figure 6B). L'interaction des RAG avec l'ADN est très limitée dans l'espace au niveau de petites régions appelées centres de recombinaisons et qui contiennent d'autres protéines telles que les HMGB1 et 2 (*High-mobility-group protein*). Ces protéines ne semblent pas indispensables à la recombinaison V(D)J in vivo mais stimulerait la liaison à l'ADN et son clivage par les RAG et favoriserait également le respect de la règle du 12-23 (revue dans (Swanson, 2004)). La figure 6C illustre un exemple de recombinaison V(D)J au niveau du locus *IGH*. En dehors de la recombinaison V(D)J, des cibles non conventionnelles des RAG ont été décrites. Les RAG peuvent en effet reconnaître des séquences similaires aux RSS appelées « RSS-like » au niveau de loci situés dans d'autres chromosomes. Les RAG peuvent également cliver des structures non canoniques de l'ADN indépendamment de leur séquence. Une régulation spatiale et temporelle de leur activité permet ainsi d'éviter ces « off-target » qui seraient impliqués dans la survenue des translocations retrouvées dans certaines hémopathies lymphoïde B et T (Gladdy et al., 2003; Küppers, 2005; Lieber et al., 2006; Tsai et al., 2008).

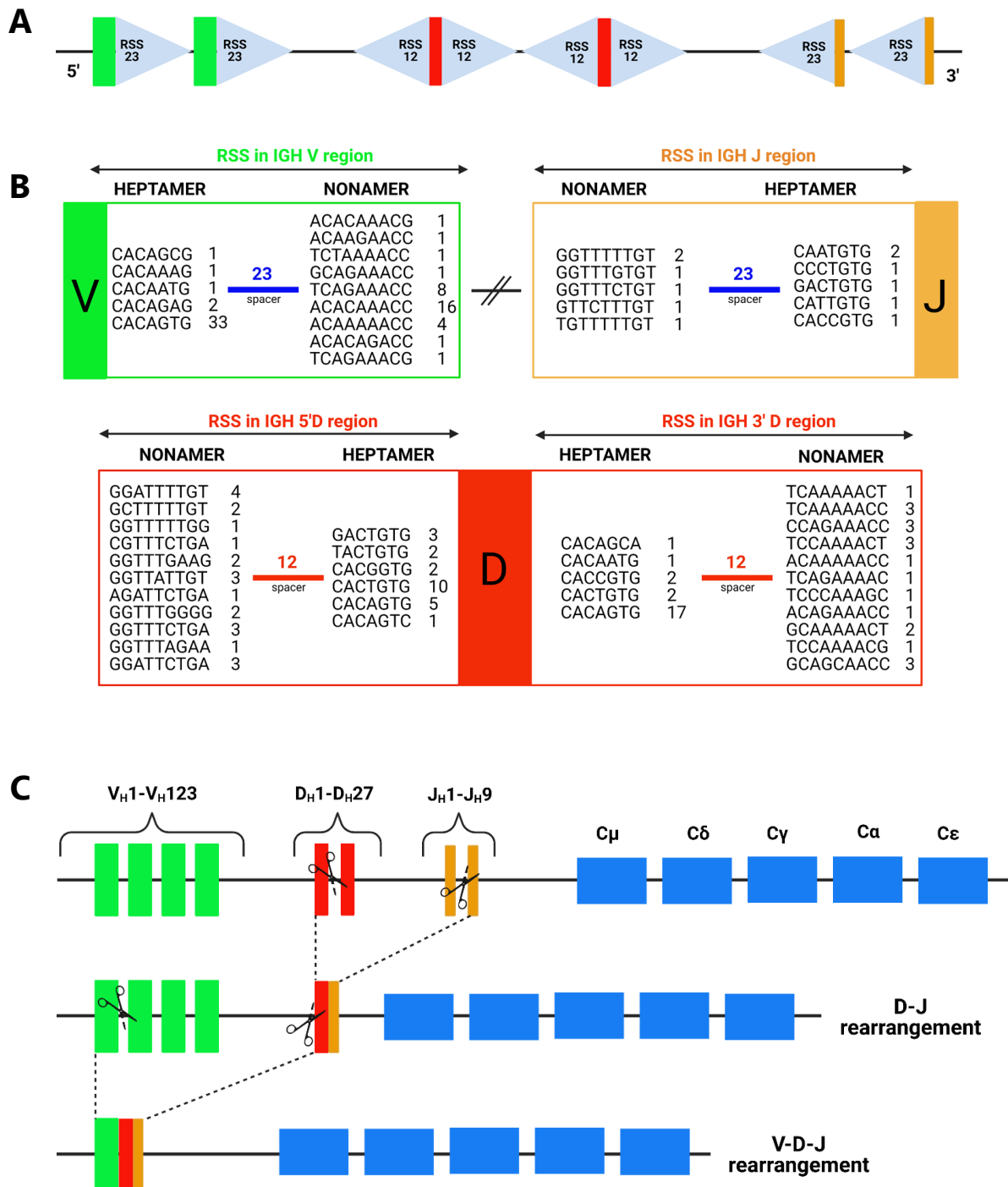


Figure 6: Recombinaison V(D)J et Séquences des signaux de recombinaison (RSS) au niveau du locus IGH.

(A) Position des RSS au niveau des segments V (en vert), D (en rouge) et J (en jaune) du locus *IGH*. Les nombres 12 et 23 correspondent au nombre de nucléotides qui séparent les séquences heptamères et nonamères. **(B)** Les différents RSS répertoriés au niveau du locus *IGH*. Les séquences des heptamères et nonamères et le nombre de nucléotides de la séquence intercalante sont représentés. Les numéros situés à droite des séquences représentent le nombre de gènes où cette séquence a été trouvée (adapté de IMGT Education (the international ImMunoGeneTics information system® <http://www.imgt.org>). **(C)** Exemple de recombinaison V(D)J initiée par les RAG au niveau du gène des chaînes lourdes d'immunoglobuline *IGH* dans les précurseurs lymphoïdes B (adapté de (Backhaus, 2018)).

2.2.2. CDBs initiées par AID dans les lymphocytes B

Lorsqu'un lymphocyte B naïf rencontre un antigène, deux modifications des gènes d'Ig peuvent survenir successivement : i) l'hypermutation somatique ou SHM (*Somatic Hypermutation*) qui introduit des mutations ponctuelles au niveau de la région variable de l'Ig pour augmenter son affinité à l'antigène ; ii) le switch ou commutation isotypique ou CSR (*Class Switch Recombination*) qui selon un mécanisme proche de celui de la recombinaison V(D)J permet de passer d'une IgM à une autre classe d'Ig (G, E ou A).

Ces deux processus, SHM et CSR, se déroulent au niveau du centre germinatif (CG) des organes lymphoïdes secondaires et sont sous le contrôle de l'AID, une enzyme spécifique des cellules B. AID est codée par le gène *AICDA* situé sur le chromosome 12. Elle cible des séquences riches en G-C au niveau des régions IgV (variables) et S (« switch regions ») et y catalyse la désamination des bases de cytosines en uraciles. Le mésappariement U:G qui en résulte est reconnu par la machinerie de réparation des mésappariements ou par l'uracyl DNA glycosylase aboutissant à une réparation, des mutations ponctuelles ou à des CDBs (Figure 7). L'activité de l'AID s'exerce sur un ADN simple brin et donc a besoin d'une transcription active comme en attestent les études montrant que dans les cellules B, AID est retrouvée dans les zones transcriptionnellement actives des loci d'Ig où elle s'associe avec Pol.II (Nambu et al., 2003; Pavri et al., 2010; Willmann et al., 2012). Les mécanismes moléculaires des processus de SHM et CSR ont été largement détaillés dans la revue (Methot and Di Noia, 2017). Dans les régions IgV, les CDBs ne sont pas nécessaires pour la SHM mais surviennent néanmoins assez fréquemment et doivent être réparées le plus rapidement. En revanche, les CDBs sont indispensables aux processus de CSR et doivent être réparées selon une orientation particulière pour une CSR correcte. L'expression de l'AID, sa localisation nucléaire ainsi que son activité sont finement contrôlées pour limiter ses effets génotoxiques. Cependant, comme pour les RAG, des off-target d'AID en dehors du locus *IGH* ont été décrits contribuant à l'oncogénicité de l'AID (Casellas et al., 2016; Robbiani and Nussenzweig, 2013). En effet, ces off-target seraient impliqués dans l'apparition de translocations chromosomiques dans des cellules lymphoïdes, impliquant *IGH* et d'autres partenaires tels que par exemple *MYC* dans le Lymphome de Burkitt ; *BCL2* dans le Lymphome Folliculaire ; *CCND1* dans le Lymphome du Manteau ou encore *BCL6* dans les Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (Küppers and Dalla-Favera, 2001; Liu et al., 2008; Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008; Tsai et al., 2008; Wang et al., 2009). Une expression aberrante d'AID a

également été rapportée dans diverses cellules tumorales non lymphoïdes d'origine gastrique, prostatique ou mammaires entre autres (Lin et al., 2009; Matsumoto et al., 2007; Nonaka et al., 2016; Pauklin et al., 2009).

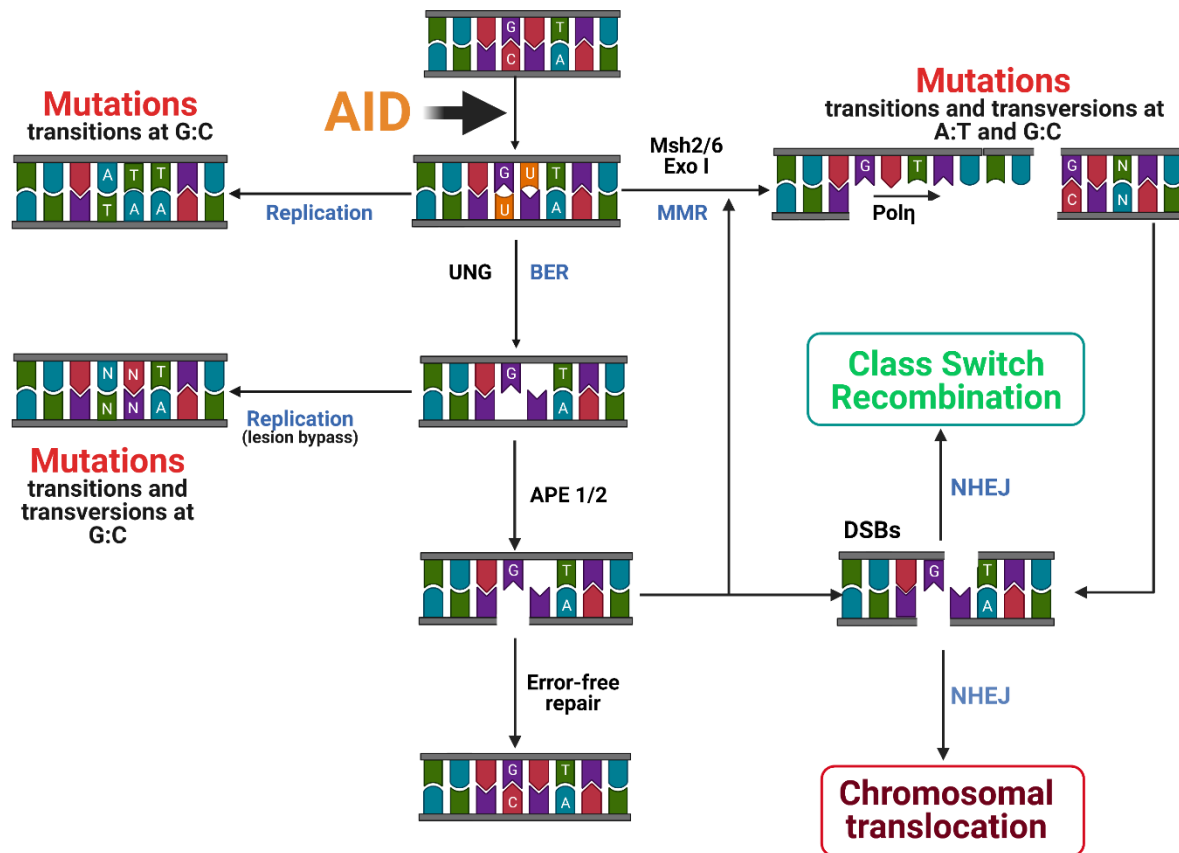


Figure 7: Mécanismes de survenue des mutations et CDBs d'ADN médiées par l'AID au cours des processus de SHM et CSR

AID catalyse la déamination des cytosines en uracile avec 3 situations possibles : i) soit la réplication survient avant les mécanismes de réparation : il en résulte des mutations à type de transition (G:C à A:T) ; ii) soit être reconnu par la machinerie de réparation des mésappariement (MMR= mismatch repair) qui excise une partie du brin d'ADN suivi de l'activité d'une ADN polymérase peu fidèle pour combler le gap, ce qui introduit des mutations à type de transition ou transversion à la fois sur les paires de bases G:C et A:T ; iii) soit les mécanismes de réparation par excision de base (BER = base excision repair) se mettent en place et l'uracil-DNA glycosylase (UNG) excise les uraciles créant ainsi des sites abasiques. Ce dernier peut soit être copié durant la réplication avec incorporation aléatoire d'un nucléotide A, T, G ou C entraînant des mutations à type de transition ou transversion ; soit être clivé par les endonucléases apuriques (APE 1 ou 2) créant une cassure simple brin d'ADN qui peut être réparé normalement sans mutation par le BER canonique. Lorsque l'APE clive deux sites abasiques assez proches sur deux brins opposés, il se forme une CDB. En revanche lorsque l'APE clive sur des brins opposés deux sites abasiques pas assez proche pour former une CDB, la MMR intervient pour créer une CDB appropriée pour la NHEJ. Les CDBs sont réparés par NHEJ au cours de la CSR mais peuvent également aboutir à la formation de translocations chromosomiques en cas de recombinaison erronée.

2.2.3. Autres sources de CDBs d'ADN

Divers mécanismes peuvent entraîner des CDBs pathologiques non programmées dans les cellules arrêtées en G1 ou en prolifération. Ces mécanismes résultent d'agression exogènes telles que les radiations ionisantes, certains agents de chimiothérapie anticancéreuse, l'exposition à des produits chimiques naturels ou industriels, à des toxines ou virus ; ou endogènes comme la

production de ROS ou au cours des erreurs de réplication (Aziz et al., 2012; Chiarle, 2013). Plusieurs facteurs peuvent prédisposer à l'apparition de ces CDBs. Des séquences ou structures particulières de l'ADN telles que les séquences Alu, les répétitions palindromiques riches en A-T, les G quadruplex ou certains sites fragiles sont associées à une susceptibilité augmentée de cassures pouvant aboutir à la formation de translocations (revue dans (Byrne et al., 2014; Chiarle, 2013)). De même, la structure de la chromatine et les modifications d'histone seraient également impliquées dans la prédisposition de certaines régions du génome aux CDBs, favorisant secondairement la formation de translocations chromosomiques. En effet, plusieurs points de cassures impliqués dans des translocations chromosomiques ont été cartographiés à proximité de zones transcriptionnellement actives enrichies en H3K4me3, H3Ac et H3K36me3 (revue dans (Roukos and Misteli, 2014)). Des CDBs d'ADN médiées par les topoisomérases et hélicases peuvent également survenir au cours de mouvements et processus normaux de la chromatine (Bohlander and Kakadia, 2015). Les cellules en méiose ont également une source physiologique de CDBs introduites par une enzyme « Topoisomérase-like » appelée Spo11 (Lieber, 2010).

2.3. Réponse aux CDBs et réparation de l'ADN

Chaque jour, une cellule peut accumuler plusieurs CDBs d'ADN. Un équilibre entre CDBs et mécanismes de réparation des dommages permet de maintenir la stabilité génomique. Ainsi, en réponse à des CDBs, la cellule doit être capable de détecter la présence de ces lésions, de déclencher une réponse appelée DDR (*DNA Damage Response*) en vue d'une réparation efficiente. Un défaut dans la réponse aux dommages d'ADN peut exposer la cellule à une réparation erronée et donc à la formation de translocations chromosomiques. L'étape du cycle cellulaire à laquelle survient la CDB ainsi que la DDR déterminent le choix de la voie de réparation. Il existe deux grandes voies de réparation des CDBs d'ADN :

- La Réparation Homologue ou HR (*Homologous Recombination*) qui est la voie conservatrice, n'introduisant pas d'erreurs dans la séquence originale. Elle nécessite la séquence homologue et donc est généralement utilisée durant les phases S ou G2 du cycle cellulaire où la chromatide sœur est disponible (Bohlander and Kakadia, 2015; Wright et al., 2018).
- La Jonction Non-Homologue ou NHEJ (*Non-Homologous End Joining*) qui ne nécessite pas toujours de séquence homologue et intervient dans toutes les phases du cycle cellulaire. La

NHEJ est subdivisée en deux sous-voie : la voie classique (cNHEJ) et la voie alternative (aNHEJ).

Dans les paragraphes suivants nous aborderons uniquement la NHEJ car étant celle associée aux translocations interchromosomique (Bohlander and Kakadia, 2015; Byrne et al., 2014; Lieber, 2010).

2.3.1. La réponse aux CDBs d'ADN (DDR)

La DDR correspond à la détection des CDBs et à la mise en place par la cellule d'une cascade de signalisation en vue d'une réparation fidèle des lésions. Cela implique l'accumulation et la coordination de nombreuses protéines impliquées dans divers processus cellulaires incluant la réparation de l'ADN en tant que telle, mais également l'arrêt du cycle cellulaire, la modification de la structure de la chromatine, la transcription, l'apoptose et la sénescence (Aleksandrov et al., 2020; Ryan et al., 2016). Les grandes étapes de la DDR en réponse à une CDB d'ADN sont résumées dans la figure 8. La DDR débute lorsque le complexe MRN (MRE11/RAD50/NBS1) reconnaît les bouts libres d'ADN, recrute et active la kinase ATM (*Ataxia Telangectasia Mutated*) (Byrne et al., 2014). ATM activé, phosphoryle une variété de substrats incluant la variante d'histone H2AX en position serine 139, NBS1, MDC1 (*Mediator of DNA damage Checkpoint 1*), 53BP1 (*p53 binding protein 1*), BRCA1 (*Breast cancer type 1 susceptibility protein*) et CHK2 (*Checkpoint Kinase 2*). Elle peut également phosphoryler en dehors du site de dommage d'ADN, d'autres protéines effectrices incluant p53 et des protéines des points de contrôle du cycle cellulaire (Ryan et al., 2016). Un des premiers événements après l'activation de l'ATM est la phosphorylation de H2AX. La forme phosphorylée de H2A.X est nommée γ H2A.X et se distribue de part et d'autre des bouts d'ADN sur une région d'environ 2Mb (Pilch et al., 2003) formant des foci détectables par des techniques d'Immunofluorescence et souvent utilisés comme marqueur de CDBs d'ADN (Kuo and Yang, 2008). γ H2A.X est reconnu par MDC1 qui interagit avec NBS1, ce qui stabilise le complexe MRN qui recrute plus d'ATM avec par conséquent une augmentation de la concentration de γ H2A.X (Bohlander and Kakadia, 2015; Ryan et al., 2016). Le recrutement des E3 ubiquitine ligases RNF8 et RNF168 dépend également de MDC1 et permet l'ubiquitination des histones H2A et H2AX ce qui favorise le recrutement d'autres facteurs incluant BRCA1 et 53BP1 (Figure 8). Ces deux protéines sont les déterminants majeurs du choix de la voie de réparation : 53BP1 protège les bouts d'ADN de la résection en 5' orientant vers la NHEJ, alors que BRCA1 favorise une résection extensive de l'extrémité 5' qui est une condition

requis pour la HR (Aleksandrov et al., 2020; Brandsma and Gent, 2012; Chapman et al., 2012; Zhang and Gong, 2021). Un autre substrat majeur de ATM est la kinase CHK2 qui une fois phosphorylée par ATM, active à son tour de nombreux substrats incluant p53, impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN (Figure 8).

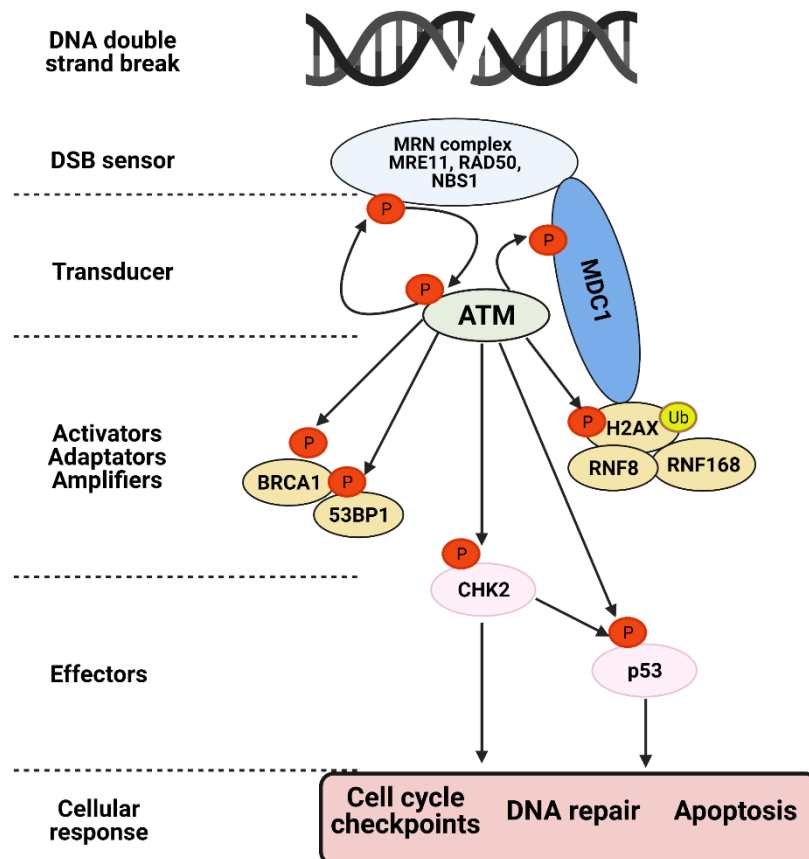


Figure 8: Schéma simplifié de la voie de signalisation ATM au cours de la DDR en réponse à des CDBs

La DDR débute lorsque le complexe MRN reconnaît les CDBs et active la kinase ATM qui à son tour phosphoryle et recrute une variété de substrats incluant les effecteurs CHK2 et p53 qui vont orchestrer la réponse cellulaire : activation des points de contrôle du cycle cellulaire, réparation de l'ADN ou apoptose lorsque les dommages sont trop importants pour être réparés. BRCA1 et 53BP1 sont les déterminants majeurs du choix de la voie de réparation d'ADN : BRCA1 oriente vers la recombinaison homologue et 53BP1 vers la NHEJ (schéma modifié et adapté de (Ryan et al., 2016)).

Un autre événement précoce de la DDR est également représenté par la poly-ADP ribosylation des queues d'histone médiée par les enzymes poly ADP ribose polymérases (PARP)1-3 (Bohlander and Kakadia, 2015), favorisant le recrutement du complexe de remodelage de la chromatine NURD/CHD4 et du complexe PcG de répression de la transcription (Chou et al., 2010). Les mécanismes d'action des PARP dans la réponse aux dommages d'ADN sont discutés dans les revues (Ko and Ren, 2012; Matkarimov et al., 2020; Pascal, 2018). La DDR implique également d'autres modifications de la structure de la chromatine pour faciliter l'accès des

protéines de réparation à l'ADN et l'inhibition de la transcription au niveau des sites endommagés (Shanbhag et al., 2010; Ziv et al., 2006). Une revue récente de Aleksandrov et al. traite en détail les modifications de la chromatine et les complexes de remodelage de la chromatine impliqués dans la DDR (Aleksandrov et al., 2020).

2.3.2. La Réparation Non-Homologue des CDBs (NHEJ)

C'est la voie de réparation prédominante chez les mammifères. Comme précédemment annoncé, elle ne nécessite pas toujours de séquence homologue et peut être mise en place quelle que soit la phase du cycle cellulaire. Elle est subdivisée en deux voies : cNHEJ et aNHEJ (Figure 9).

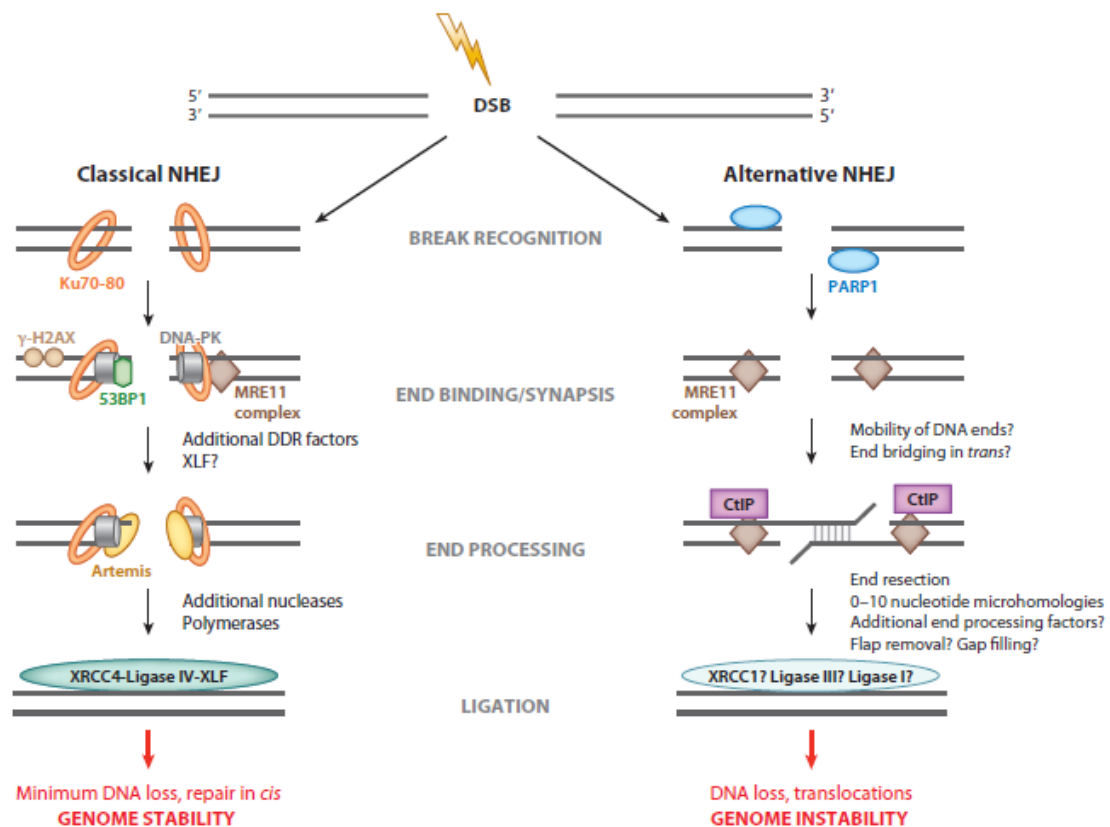


Figure 9: Les différentes voies de jonction non homologue des cassures double brins d'ADN.

La NHEJ classique fait intervenir l'hétérodimère Ku70/80, le complexe MRN, le complexe DNA-PK, artemis, le complexe ligase IV-XRCC4 et d'autres enzymes de traitement des bouts de l'ADN. Elle est moins sujette à des erreurs et assure une stabilité génomique. La NHEJ alternative implique la polymérase PARP1, le complexe MRN qui assure la résection de l'extrémité 5' d'une cassure d'ADN, CtIP et la ligase I ou le complexe ligase III-XRCC1. Elle est moins fidèle, source d'erreurs et d'instabilité génomique. Selon (Deriano and Roth, 2013).

2.3.2.1. Mécanismes de réparation par cNHEJ

cNHEJ débute lorsque l'hétérodimère Ku70/80 reconnaît la CDB et se fixe sur les bouts de part et d'autre en formant un anneau. Ku est très abondant dans la cellule et possède une affinité pour divers types de CDBs : bouts émoussés, en surplomb ou en « épingle de cheveux » (Bernstein et al., 2005). Le complexe Ku-ADN pourra alors servir de socle pour la fixation des autres protéines de réparation (nucléases, polymérases et ligases) (Lieber, 2010). La fixation de Ku active le recrutement de la sous-unité catalytique de la protéine kinase dépendante de l'ADN (DNA-PKcs) formant le complexe DNA-PK. DNA-PKcs s'autophosphoryle et phosphoryle en même temps la chromatine aux alentours et d'autres protéines telles que Ku, artemis, ligase IV, XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*) et XLF (*XRCC4-like factor*) (Neal and Meek, 2011), favorisant leur activation et recrutement (Aleksandrov et al., 2020). Avant la ligation, la restauration de la configuration conventionnelle 3'OH-5'P des bouts d'ADN est nécessaire et est assurée par des protéines appelées enzymes de traitement des bouts (Figure 10). L'endonucléase artemis est recruté via son interaction avec DNA-PK (Goodarzi et al., 2006) et agit sur les bouts courts en surplomb ou en « épingle à cheveux ». La nucléase APLF (aprataxin and PNKP-like factor) intervient également dans la cNHEJ via ses activités apurinique/apyrimidique endonucléase et 3'-5' exonucléase (Grundy et al., 2013; Iles et al., 2007). Les résidus 3'phosphoglycolates sont éliminés par la Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1) et ceux d'AMP par l'aprataxine (Ahel et al., 2006; Flett et al., 2018). La Polynucléotide kinase 3'-phosphatase (PNKP) possède une activité kinase et phosphatase et, est chargé au besoin d'ajouter un groupe phosphate aux extrémités 5' et d'en enlever aux extrémités 3' des CDBs (Bernstein et al., 2005). Les hélicases WRN (Werner syndrom protein) et BLM (Bloom) participerait également aux modifications des bouts de cassures pour rendre la ligation possible (Deriano and Roth, 2013; Grundy et al., 2013). Trois ADN polymérases λ , μ et Tdt (uniquement dans les cellules avec recombinaison V(D)J) assurent l'ajout de nucléotide à l'extrémité 3' des bouts de cassure jusqu'à ce que la ligation soit possible (Nick McElhinny et al., 2005; Ramsden, 2011). La ligation des deux bouts d'ADN est assurée par le complexe ligase IV-XRCC4 en collaboration avec XLF et PAXX (*Paralog of XRCC4 and XLF*) (Brouwer et al., 2016; Gu et al., 2007; Ochi et al., 2015).

La cNHEJ restaure ainsi la continuité physique de l'ADN mais parfois avec des micro-insertions ou micro-délétions aux points de jonction, ce qui en fait une voie de réparation non fidèle. Cette

caractéristique constitue cependant un avantage pour les processus de recombinaison V(D)J, SHM et CSR (Boboila et al., 2012; Helmink and Sleckman, 2012; Roth, 2003; Soulas-Sprauel et al., 2007) où ces mutations ponctuelles contribuent à la diversité des anticorps. cNHEJ conduit rarement à des translocations chromosomiques. Au contraire, il semblerait qu'elle en protège les cellules. En effet, les cellules déficientes en cNHEJ font plus de translocations que les cellules normales (Simsek and Jasin, 2010; Weinstock et al., 2007). De plus, les souris déficientes pour la cNHEJ développent, en l'absence de la protéine p53, des lymphomes pro-B avec des translocations impliquant *IGH* et *c-MYC* ou *n-MYC* (Difilippantonio et al., 2002; Gostissa et al., 2011; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2002).

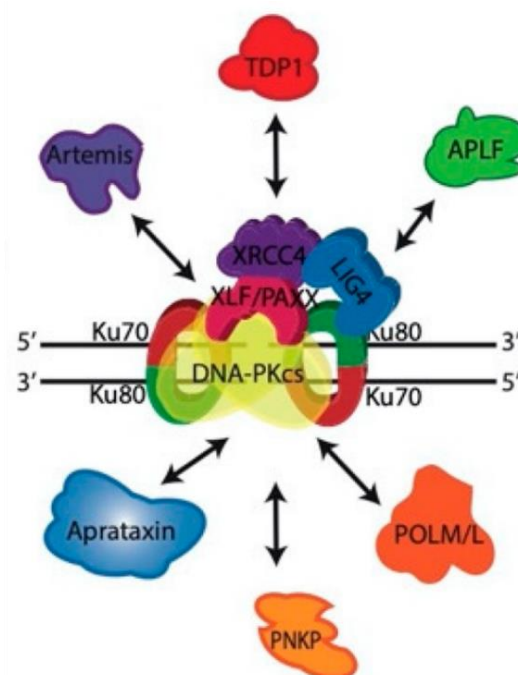


Figure 10: Enzymes impliquées dans la modification des bouts de cassure d'ADN avant la ligation au cours de la cNHEJ.

Adapté de (Aleksandrov et al., 2020).

2.3.2.2. Mécanismes de réparation par aNHEJ

aNHEJ est encore appelée MMEJ (*Microhomology-mediated end joining*) ou B-NHEJ (back-up NHEJ) (Deriano and Roth, 2013). Il n'est pas encore bien établi s'il s'agit d'une voie authentique de réparation réservée à un certain type de CDBs ou si elle représente une alternative par défaut (back-up) lorsque la cNHEJ est impossible (Scully et al., 2019). Des études ont montré que aNHEJ était présente aussi bien dans des cellules déficientes en cNHEJ (Kabotyanski et al., 1998; Liang

and Jasin, 1996) que dans les cellules non déficientes (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007) avec plus ou moins la même fréquence au moins sur l'ADN extrachromosomique (Corneo et al., 2007).

Contrairement à cNHEJ, la voie alternative requiert la résection de l'extrémité 5' d'un brin de la cassure, généralement sur 15 à 100 nucléotides, permettant ainsi d'exposer des micro-homologies distantes de la CDB et pouvant servir de modèle (Chang et al., 2017). Cette résection est assurée par le complexe MRN et CtIP (Myler et al., 2017). La poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP1) entre en compétition avec Ku pour se fixer sur l'ADN et favorise le recrutement des facteurs de réparation en amont, incluant la polymérase θ (Pol θ), un médiateur clé de aNHEJ (Ray Chaudhuri and Nussenzweig, 2017). L'action de Pol θ peut être précédée par celle de nucléases telles que Artémis, XPF-ERCC1 ou APLF pour rendre les extrémités de l'ADN joignable. La forme phosphorylée de CtIP servirait également de pont aux deux brins d'ADN pour faciliter l'appariement (Öz et al., 2020). La jonction est réalisée par la ligase 1 ou le complexe ligase 3-XRCC1 (Masani et al., 2016) (Figure 9). Des micro-homologies, de larges délétions ou des insertions de larges segments d'ADN d'origine inconnue caractérisent les points de jonction des CDBs réparées par aNHEJ (Deriano and Roth, 2013). aNHEJ apparaît ainsi comme une voie de réparation mutagénique qui est plus propice à la formation des translocations chromosomiques. Il a été démontré que certains facteurs impliqués dans aNHEJ tels que la ligase 3 (Simsek et al., 2011) ou la nucléase CtIP (Lee-Theilen et al., 2011; Zhang and Jasin, 2011) sont essentielles pour la formation de translocations chromosomiques. Les caractéristiques des points de jonction réparés par aNHEJ sont présentes dans les translocations chromosomiques retrouvées aussi bien dans des lymphomes B de souris déficientes en cNHEJ (Deriano and Roth, 2013) que dans des tumeurs humaines (Gostissa et al., 2011; Stephens et al., 2009; Zhang and Rowley, 2006), suggérant une réparation par aNHEJ.

2.4. Proximité spatiale entre les deux loci

2.4.1. Arguments en faveur de la corrélation entre proximité spatiale et fréquence de translocation

Après CDBs simultanées sur différents loci, leur recombinaison requiert une interaction physique avec appariement des CDBs. Nous avons vu précédemment que le génome était organisé de

façon non aléatoire dans l'espace tridimensionnelle du noyau, les chromosomes et loci occupant des positions préférentielles.

De nombreuses études utilisant des techniques de FISH ont retrouvé une corrélation positive entre la proximité entre deux chromosomes et leur probabilité de translocation (Branco and Pombo, 2006; Nikiforova et al., 2000; Parada and Misteli, 2002; Roccato et al., 2005; Roix et al., 2003). Deux chromosomes situés à proximité l'un de l'autre auraient plus de chances de former une translocation que deux chromosomes distants (Misteli, 2010; Roukos et al., 2013) (Figure 11). La fréquence des translocations robertsoniennes entre deux chromosomes acrocentriques qui généralement forment un cluster dans le nucléole en est un argument en faveur (Sullivan et al., 2001; Therman et al., 1989). De plus, un chromosome situé en périphérie transloquerait plus fréquemment avec un autre chromosome périphérique qu'avec un chromosome en position interne dans le noyau (Branco and Pombo, 2006). Plus intéressant encore, en périphérie des territoires chromosomiques, la chromatine entre deux territoires distincts peut s'entremêler. Il a été démontré que dans les lymphocytes, le degré d'entremêlement entre deux chromosomes est fortement corrélé à leur fréquence de translocation (Branco and Pombo, 2006; Roukos and Misteli, 2014).

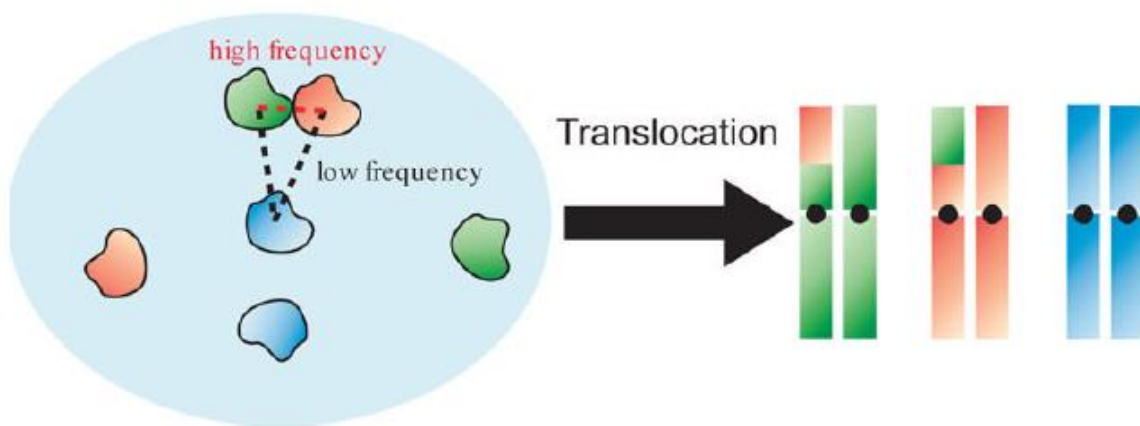


Figure 11: Proximité spatiale des chromosomes et fréquence des translocation chromosomique
Il existe une corrélation positive entre la distance qui sépare deux chromosomes et leur probabilité de translocation : la fréquence des translocation est plus élevée lorsque les deux chromosomes sont situés à proximité l'un de l'autre. Selon (Meaburn et al., 2007).

L'organisation du génome étant également tissu et cellule spécifique (Parada et al., 2004), il est compréhensible que certains chromosomes soient plus prompts à former une translocation dans certains tissus comparés à d'autres. Par exemple, chez la souris, les chromosomes 12 et 15

transloquent plus fréquemment dans les lymphocytes où ils sont très proches que dans les hépatocytes ; alors que les chromosomes 5 et 6 forment communément une translocation dans les hépatocytes et non dans les lymphocytes (Parada and Misteli, 2002; Parada et al., 2004). Chez l'homme, les chromosomes 12 et 16 qui forment souvent une translocation dans les liposarcomes, apparaissent très proches l'un de l'autre au cours de l'adipogénèse (Kuroda et al., 2004).

Cette corrélation entre proximité spatiale et translocation s'étend à l'échelle des gènes. A titre d'exemple, dans les cellules B, la distance qui sépare *MYC* de ses trois partenaires potentiels au cours du Lymphome de Burkitt *IGH*, *IGK* et *IGL* est corrélée à la fréquence respective de ces translocations observée chez les patients (Roix et al., 2003). Les mêmes corrélations entre proximité des loci et fréquence de translocation ont été faites entre *IGH* et certains des partenaires de translocation au cours de lymphomes *CCND1*, *BCL2* et *BCL6* (Roix et al., 2003); entre *BCR* et *ABL* dans la Leucémie Myéloïde chronique et *PML* et *RARA* dans la Leucémie Aigue Promyélocytaire (Neves et al., 1999) ou encore entre *TMPRSS2* et *ERG* dans les cancers de la prostate (Lin et al., 2009). De manière générale, il est admis que plus de 80% des translocations surviennent lorsque les CDBs sont localisées à moins de 2,5µm de distance ; au-delà de 5µm la fréquence des translocations étant relativement faible (Roukos et al., 2013).

2.4.2. Mécanismes cellulaires d'induction de la proximité spatiale

Deux modèles existent concernant les mécanismes par lesquels les CDBs de deux chromosomes différents pourraient se retrouver à proximité l'un de l'autre favorisant ainsi une recombinaison illégitime et la survenue de translocation.

⇒ **Le modèle du « contact-first »**

Ce modèle suppose que les deux loci impliqués dans la translocation soient déjà colocalisés au moment où surviennent les CDBs simultanées. Les CDBs restent alors en position relativement stable ou au maximum, seuls des mouvements locaux et limités sont attendus (Figure 12A) (Savage, 1993, 2000). Cela supposerait, soit qu'à la base les deux loci étaient situés à proximité l'un de l'autre ; soit qu'un processus physiologique (par exemple différenciation, réplication ou transcription) ou pathologique (infection virale, cancer...) favorise un remodelage de l'architecture nucléaire amenant deux loci normalement situés dans des compartiments nucléaires différents à proximité l'un de l'autre. Cette dernière hypothèse pourrait s'appliquer à

MYC et *IGH* dans le cadre de la translocation t(8 ;14) du LB. En effet, dans les lymphocytes B naïfs, *MYC* et *IGH* sont localisés dans des compartiments nucléaires différents (Roix et al., 2003; Sklyar et al., 2016). Cependant au cours des processus de SHM et de CSR suivant l'activation des cellules B, *MYC* est relocalisé à proximité d'*IGH* où ils partagent la même usine de transcription (Sklyar et al., 2016). Cette proximité entre *MYC* et *IGH*, associée à la surexpression d'AID dans les cellules B activées (Xu et al., 2007), augmente la probabilité de CDBs simultanées sur les deux loci et l'apparition de translocation (Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008; Rocha et al., 2012).

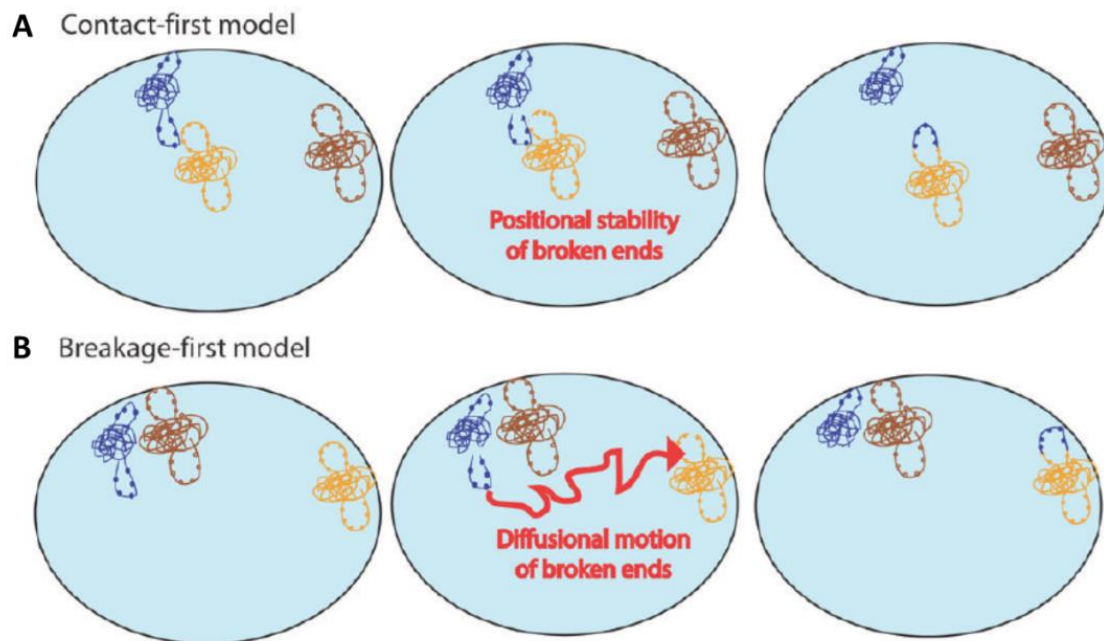


Figure 12: Mécanismes de la proximité spatiale entre deux loci dans la formation des translocations : modèles du "contact-first" et "breakage-first"

A) Le modèle du « contact first » suggère que les deux chromosomes partenaires de translocation sont déjà à proximité l'un de l'autre lorsque survient la CDB. B) Le modèle du « breakage first » suggère que les CDB surviennent en premier et c'est à la suite d'un mouvement de diffusion que les deux CDB se retrouvent à proximité l'un de l'autre. Adapté de (Meaburn et al., 2007)

⇒ **Le modèle du « breakage-first »**

Dans ce modèle, il est proposé que les CDBs simultanées surviennent alors que les loci sont situés loin l'un de l'autre. Ce qui implique la possibilité de mouvements à grande échelle des CDBs dans l'espace nucléaire à la recherche de potentiels partenaires (Figure 12B) (Aten et al., 2004; Savage, 2000). Une augmentation de la mobilité de la chromatine en réponse à des dommages d'ADN a été rapportée et refléterait l'exploration de l'espace nucléaire par les CDBs

à la recherche de donneur homologue pour la réparation (Miné-Hattab and Chiolo, 2020; Miné-Hattab and Rothstein, 2012; Neumann et al., 2012). Cette mobilité de la chromatine est également corrélée à une relaxation de la chromatine pour favoriser l'accès des facteurs de réparation à l'ADN (Hauer et al., 2017; Iarovaia et al., 2014; Kruhlak et al., 2006; Seeber et al., 2013; Ziv et al., 2006). L'augmentation de la mobilité de la chromatine est médiée par les complexes de remodelage de la chromatine et les protéines de la machinerie de réparation de l'ADN (Dion et al., 2012; Neumann et al., 2012; Smith et al., 2018). Les CDBs peuvent être relocalisées dans des compartiments nucléaires plus propices à la réparation où elles peuvent se regrouper dans des « centres de réparation » (Aten et al., 2004; Neumaier et al., 2012). Certes, ces centres faciliteraient la réparation de l'ADN mais augmentent également la probabilité de recombinaison illégitime entre deux CDBs. Parmi les facteurs de réparation de l'ADN, la protéine MRE11 pourrait jouer un rôle important dans la relocalisation des CDBs ainsi que dans l'appariement de deux CDBs et leur translocation (Aten et al., 2004; Caridi et al., 2018; Roukos et al., 2013).

Cependant, ces deux modèles ne s'excluent pas mutuellement. En effet, nous avons récemment décrit sur le locus *MYC* de cellules B humaines circulantes traitées avec la protéine Tat du VIH-1, des CDBs RAG1-dépendante avec une relocalisation secondaire de *MYC* à proximité d'*IGH* au sein d'une même usine de transcription (Germini et al., 2017).

2.5. Article 1 : Revue « Effects of environmental factors on nuclear organization and transformation of human B lymphocytes »

Dans cet article, nous avons passé en revue les données disponibles sur l'effet de facteurs environnementaux viraux (EBV et VIH), parasitaires (*P. falciparum*) et végétaux (*Euphorbia tirucalli*) sur l'architecture nucléaire des lymphocytes B pouvant favoriser la formation de translocations chromosomiques, particulièrement la translocation t(8;14) entre *MYC* et *IGH* du LB. Il ressort de cette revue que ces différents facteurs, directement ou par l'intermédiaire de leurs composantes, peuvent perturber l'organisation nucléaire des lymphocytes B essentiellement par une activation chronique des lymphocytes B, par induction de dommages d'ADN, ou par interaction avec les complexes de remodelage de la chromatine ou les mécanismes de régulation épigénétiques.

REVIEW

Effect of Environmental Factors on Nuclear Organization and Transformation of Human B Lymphocytes

F. B. Sall^{1,2,3#}, D. Germini^{1,2#}, A. P. Kovina^{1,2,4}, V. Ribrag^{5,6}, J. Wiels^{1,2}, A. O. Toure³,
O. V. Iarovaia^{2,4}, M. Lipinski^{1,2}, and Y. Vassetzky^{1,2,7*}

¹UMR8126, Université Paris-Sud, CNRS, Institut de Cancérologie Gustave Roussy,
94805 Villejuif, France; E-mail: vassetzky@igr.fr, vassetzky@gmail.com

²LIA1066 "Laboratoire Franco-Russe de Recherche en Oncologie", 94805 Villejuif, France

³Laboratoire d'Hématologie Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec,
Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Sénégal

⁴Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

⁵Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

⁶Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) Unité (U) 1009,
Université Paris Sud, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France

⁷Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia

Received November 10, 2017

Revision received December 8, 2017

Abstract—Chromosomal translocations have long been known for their association with malignant transformation, particularly in hematopoietic disorders such as B-cell lymphomas. In addition to the physiological process of maturation, which creates double strand breaks in immunoglobulin gene loci, environmental factors including the Epstein–Barr and human immunodeficiency viruses, malaria-causing parasites (*Plasmodium falciparum*), and plant components (*Euphorbia tirucalli* latex) can trigger a reorganization of the nuclear architecture and DNA damage that together will facilitate the occurrence of deleterious chromosomal rearrangements.

DOI: 10.1134/S0006297918040119

Keywords: Burkitt lymphoma, EBV, HIV, *Plasmodium falciparum*, *Euphorbia tirucalli*, oncogenesis, nuclear organization

In humans, malignant transformation is often associated with specific chromosomal translocations. Those result from two DNA double strand breaks (DSBs) erroneously repaired through non-homologous end joining (NHEJ). Proximity (colocalization) of the two translocation partners in the 3D nuclear space is necessary for translocations to take place.

DSBs can be generated by a variety of exogenous factors including ionizing radiations, chemotherapeutic drugs, and infectious agents or toxins. The production of

reactive oxygen species (ROS) or enzyme-dependent physiological processes such as the chromosomal rearrangements that occur during the normal maturation of B and T lymphocytes also generate DNA breakage.

DYNAMICS OF NUCLEAR ORGANIZATION, DNA DAMAGE, AND TRANSLOCATIONS

With chromosomes nonrandomly arranged in the nuclear space and occupying so-called chromosome territories [1], genomes are spatially organized in tissue- and cell type-specific ways [2, 3]. In general and regardless of the proliferation status of the cell, gene-rich and smaller chromosomes tend to be located in central areas of the nucleus, while gene-poor and larger chromosomes mostly lie in the nuclear periphery [2, 4-6]. Gene loci also exhibit nonrandom and gene-specific distribution patterns in the interphase nucleus [7]. The interaction between distinct chromosomes can activate genes in *trans*

Abbreviations: AICDA, activation-induced cytosine deaminase; BL, Burkitt lymphoma; CSR, class switch recombination; DSBs, DNA double strand breaks; EBV, Epstein–Barr virus; HIV, human immunodeficiency virus; NHEJ, non-homologous end joining; RAG1(2), recombination activating gene 1(2); ROS, reactive oxygen species; SHM, somatic hypermutation.

These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed.

resulting in colocalization of actively transcribed gene loci on different chromosomes [8]. The precise positioning of genes in the nuclear space, which is important for essential DNA transactions including transcription, replication, and repair [9, 10], reviewed in [11], evolves during development, differentiation, and aging, and during cellular responses to stress and various stimuli. The molecular factors that control this 3D (re)positioning remain largely unknown.

Chromosomal movements are known to accompany DNA repair, creating the possibility that two loci normally located away from each other are brought together [12–14]. Two alternative models have been proposed. In the “contact-first” model, both chromosomal partners lie in the vicinity of each other at the time of DNA damage. Live imaging analysis has shown that more than 80% of the translocations are created when DNA breaks are produced on two different chromosomes within a distance less than 2.5 μm [15]. Translocations are less frequent if the breaks are separated by 5 μm or more [15]. Usually, neither damaged nor intact chromatin fibers undergo extensive movements [12, 16]. However, the “break-first” model postulates that chromosomes are first broken away from each other and then move in the nuclear space and find their translocation partner. Indeed, under certain circumstances (e.g. large scale DNA damage or the intervention of the DNA repair factors) an enhanced mobility has been demonstrated for damaged DNA [13, 17]. As often, “break-first” and “contact-first” mechanisms can combine to produce a translocation. In this respect, we reported recently that inducing DSBs in the *MYC* locus in peripheral B-cells incubated in the presence of an HIV protein results in *MYC* relocating proximal to *IGH* gene loci (see further below) [18].

Recently, epigenetic modifications have been shown to have an impact on the susceptibility of chromatin to undergo DNA DSBs and on the movements of broken chromosomes [19]. Histone posttranslational modifications that regulate gene transcription have such an impact on chromosome breakages and ensuing translocations [20]. It has been reported that the methylation of K4 and K36 on histone H3 facilitates chromatin decondensation and also DSB formation [21]. In addition, chromosomal regions enriched in H3K4me3 constitute preferential targets for two enzymes, Recombination Activating Gene (RAG) 2 and Activation-Induced Cytosine Deaminase (AICDA) involved in V(D)J recombination and Class Switch Recombination (CSR) in normal B cells [22, 23]. That DSBs occur predominantly in transcriptionally active regions [24–26] comes as no surprise, since the recruitment of transcription factors further opens the chromatin structure. In turn, such sites become more susceptible to DNA damage and prone to translocations [27, 28].

Transcription is also regulated by the methylation/demethylation of genomic DNA within

CpG islands present in as much as 70% of gene promoters [29]. Interestingly, 40 to 70% of the breakpoints specifically associated with pro-B and/or pre-B leukemias and lymphomas are found in the vicinity of such CpG-rich regions [30]. Moreover, independently of their methylation status, the cytosine residues in the CpG islands are potential targets for AICDA, which can induce their deamination resulting in single-nucleotide mismatches that in turn become targets for nucleases including RAG1/2 [31].

Transcription is not the only process that leads to chromatin decondensation. Local chromatin structures can be modified by many chromatin remodeling complexes involved in different DNA transactions [32, 33]. Along with these changes, large-scale chromatin motions occur due to the increased flexibility of the chromatin fiber [33]. All together, these findings suggest the existence of a functional relationship between mechanisms of epigenetic regulation, the occurrence of DSBs, and the deleterious production of chromosomal rearrangements.

BURKITT LYMPHOMA AND NUCLEAR GENE RELOCALIZATION

Burkitt lymphoma (BL) is a highly aggressive B-cell lymphoma with three clinically distinct presentations [34, 35]. The endemic form is observed in children in Central Africa, particularly in areas with holoendemic malaria where it is virtually always associated with an infection by the Epstein–Barr virus (EBV) [36, 37]. The sporadic form of BL seen all over the world in patients usually in their teens, has an EBV prevalence of ~10–20% [34]. The third form, which occurs in HIV-infected patients, exhibits an intermediary level (~40–50%) of EBV prevalence [34, 36, 38]. What is constant in all three forms, is the existence of one among three possible chromosomal translocations, all involving the *MYC* oncogene on chromosome 8 rearranged either with the immunoglobulin (Ig) heavy chain gene locus (*IGH*) on chromosome 14, or with one of the two chromosomes carrying the Ig light chain genes *IGK* on chromosome 2 or *IGL* on chromosome 22. The t(8;14) translocation is the most frequent, being found in ~80% of the cases. The resulting juxtaposition of *MYC* and *IGH* leads to hyperactivation of *MYC* [38–40] via its relocation from the periphery towards a perinucleolar region [41] in a more central position in the nucleus [42]. Similarly to *MYC*, *IGK* is often found near the nuclear periphery, but not *IGL*, which resides closer to the nuclear center while *IGH* is mostly found in regions located in-between [43]. Thus, the frequency of *MYC* rearrangement with either one of the three *Ig* gene loci could be directly related to its relative proximity with each of them [18, 43, 44].

In normal peripheral blood B-cells, the *IGH* and *MYC* gene loci are separated by approximately 40% of the nuclear diameter [18, 41, 43]. At the time of Somatic

Hypermethylation (SHM) and CSR in both human and murine B-cells, *MYC* relocalizes close to an *IGH* locus [41, 45] in the vicinity of the so-called “recombination compartment”, which is enriched in AICDA [46], one enzyme absolutely required for *Ig* gene maturation [47, 48]. Through its enzymatic activity, AICDA deaminates cytidines and produces U:G mismatches [49]. It can also target and modify regions outside *IGH*, as demonstrated when overexpressed in murine activated B-cells [47, 48, 50]. Indeed, proximity to *IGH* predisposes to AICDA targeting with 90% of the AICDA hotspots being found in gene loci located in the vicinity of the *IGH* locus [50]. AICDA can thus induce chromosomal breaks in the *MYC* region [47, 48], which in turn increases the probability of *IGH/MYC* translocations. Below, we will briefly review various environmental factors that have been shown to increase the risk of occurrence of a BL-associated chromosomal translocation.

BL-ASSOCIATED ENVIRONMENTAL FACTORS AND NUCLEAR ORGANIZATION

Viruses (EBV and HIV), the malaria parasite *Plasmodium falciparum*, and the latex of the plant *Euphorbia tirucalli* are some of the etiological factors that have been associated with the endemic form of BL, but the mechanism whereby these factors contribute to lymphomagenesis remain largely unknown. Their ability to affect the nuclear organization could play a role in BL oncogenesis. Here we will describe and summarize their impact on B-cells nuclear organization and the consequences in terms of lymphomagenesis.

EBV. BL was the first human tumor associated with a virus [51]. The Epstein–Barr virus (EBV) is a human gamma-herpesvirus with a tropism for B lymphocytes and an ability to establish long term persistence in memory B-cells. The EBV life cycle includes two phases: viral particles are produced in the lytic phase; in the latent phase, extrachromosomal episome persists in the nucleus [52].

EBV can remodel the nuclear organization, changing the positioning of chromosomes in infected cells [53]. EBV-positive cells also exhibit additional chromosomal aberrations such as dicentric chromosomes, chromosome fragments, and chromatid gaps, suggesting that chromosome breaks are produced along with defects in DNA repair [54, 55].

EBV latency. The latent phase of EBV infection is characterized by expression of several nuclear antigens (Epstein–Barr Nuclear Antigen [EBNA]-1, -2, -3A, -3B, -3C, and -LP), membrane proteins (Latent Membrane Protein [LMP]-1, -2A, and -2B), and noncoding RNA (EBER-1 and -2) [56]. The EBV Nuclear Antigen-1 (EBNA-1), expressed in both the latent and lytic phases of EBV infection [57], was found to induce DSBs via production of ROS with consequent chromosomal instabil-

ty [55]. Its expression leads to the deregulation of several genes involved in the maintenance of chromatin organization [58]. EBNA-1 can also induce chromatin decondensation [59]. EBNA-2, a transcriptional activator of both viral and cellular genes, is expressed during latent infection of B lymphocytes and is necessary for B-cell immortalization [60]. It can interact with histone acetyltransferases (HATs) and the SWI/SNF chromatin remodeler complex, thus disturbing the chromatin organization including in the upstream region of *MYC* [61]. EBNA-3 proteins also play an important role in B-cell immortalization [62]. EBNA-3C can activate the expression of AICDA by directly binding to upstream regulatory elements, where it provokes increased H3K4 trimethylation [63]. The latent protein LMP-1 participates in epigenetic regulation of the host genome by modulating the expression of three DNA methyltransferases – DNMT1, DNMT3A, and DNMT3B [64].

EBV reactivation from latency. The activation of *BZLF1* gene transcription leads to the switch from the latent to the lytic phases. The BZLF1 protein (Zebra or Zta) is a transcriptional transactivator that promotes transcription of viral genes inducing the viral lytic cycle [65]. The Zta protein also induces oxidative stress-mediated DNA damage by interacting with p53 [66, 67]. Inducing the EBV lytic cycle distorts the nuclear architecture, resulting in chromatin condensation at the nuclear periphery and formation of transcription factories in the nuclear center [68]. BGLF4 kinase, another key protein for EBV reactivation, phosphorylates and activates BZLF1 [69]. BGLF4 may play a role in marginal chromatin condensation by activating DNA topoisomerase II and phosphorylating condensin [70]. This could increase the risk of DNA breaks, as premature chromatin condensation is associated with a high risk of chromosomal breaks at common fragile sites [71].

The genome of the EBV resembles a small human chromosome in many ways. During latency, the EBV genome interacts with repressive heterochromatin, but upon spontaneous reactivation when EBV transcription drastically increases, the episome leaves the repressive environment and surrounds itself with active chromatin, leading to rearrangement of neighboring gene loci [72]. EBV can also integrate into the host genome [73] in sites located inside or in the vicinity of regions that harbor potential genome structural variations [74]. Thus, EBV integration can induce genome instability.

HIV-1. Infection by HIV-1 is associated with a significantly elevated incidence of cancer, particularly B-cell lymphomas [75, 76]. In Europe and in the US, the BL incidence is significantly higher in HIV-infected individuals compared with healthy subjects [18, 77]. This is also true for BL endemic zones where BL patients are 10–12 times more prone to be HIV-positive than healthy people [78]. Intriguingly, HIV cannot infect B-cells. Thus, the elevated risk of BL in HIV patients can be

caused either by immunodeficiency induced by AIDS or by HIV having a lymphomagenic role by itself.

According to one hypothesis, HIV induces chronic B-cell activation through an immune dysfunction leading to a deregulated clonal expansion of B lymphocytes [79]. Uncontrolled persistent stimulation of B lymphocytes may favor the uncontrolled monoclonal proliferation with as a consequence an increased risk of acquiring critical genetic alterations, ultimately leading to lymphoma development [79]. As already mentioned, AICDA is overexpressed in hyperactivated B-cells [48, 80]. Moreover, in EBV-infected patients, HIV infection can lead to EBV lytic cycle reactivation [34]. In these conditions of immunodepression induced by HIV, EBV-induced cell proliferation fails to be fully controlled by the immune system, resulting in an increased number of latently infected B-cells [34, 81].

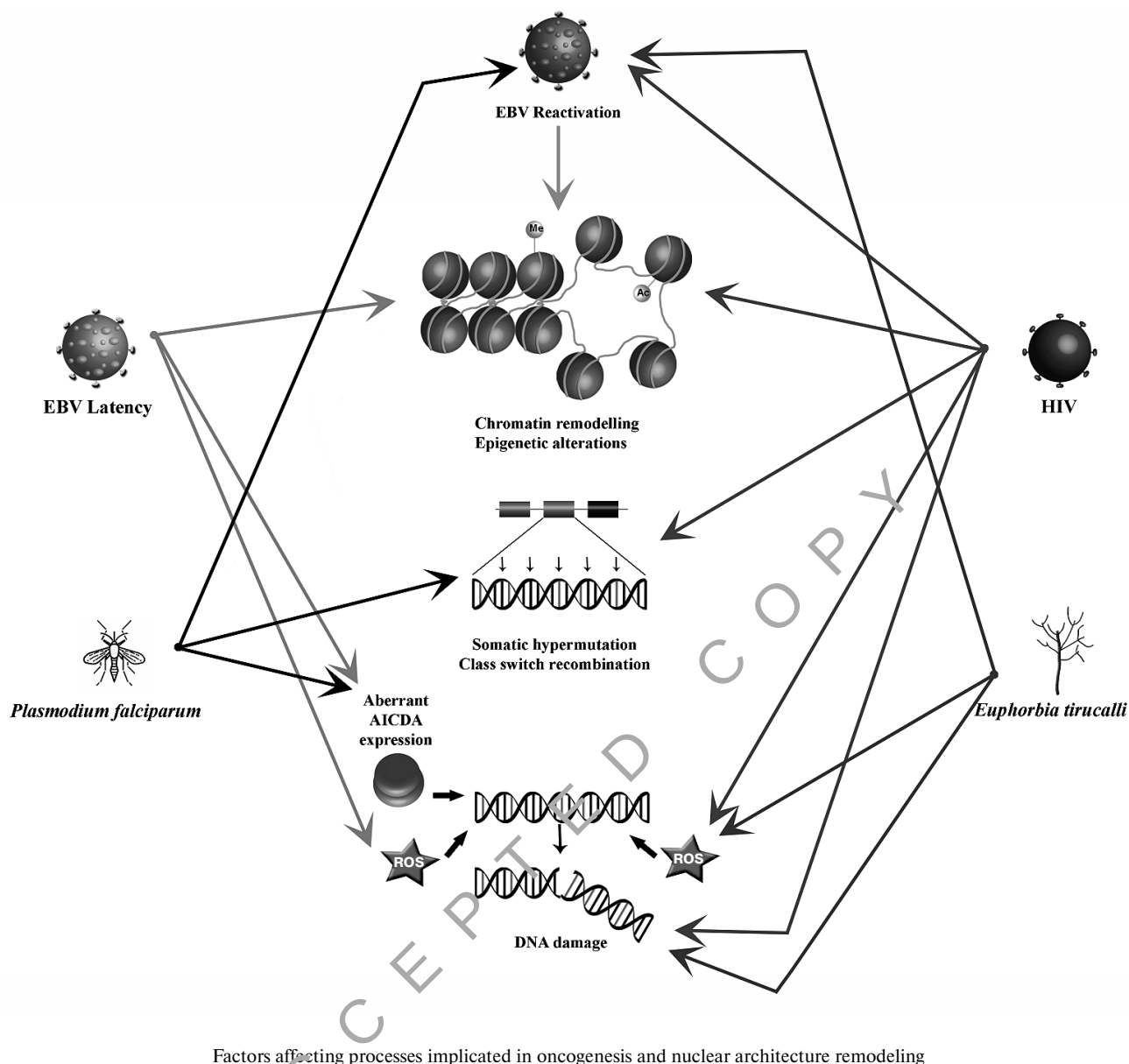
Alternatively, since the risk of BL remains elevated in patients under combined antiretroviral therapy (cART) and with normal CD4 counts [82, 83], a direct role of HIV in BL oncogenesis can be postulated. Our recent studies have demonstrated that the HIV-1 transactivator protein Tat, a small protein that is secreted into blood by infected cells and capable of penetrating B-cells, can modify their nuclear organization. It induces the displacement of one *MYC* allele from the periphery of the nucleus to the center, in close proximity with *IGH*, as a consequence of aberrant activation of *RAG1* and *MYC* [18]. This proximity between *MYC* and *IGH* could predis-

pose to BL development. Tat can also significantly increase oxidative stress-derived DNA damage in B-cells leading to a general chromosomal instability, which could potentially induce diffuse large B-cells lymphoma or Hodgkin lymphoma [84].

***Plasmodium falciparum*.** The association of malaria with endemic BL, the most common tumor in young children in tropical Africa, was observed for the first time almost 50 years ago [39, 85]. Malarial infection is caused by a protozoan parasite of the genus *Plasmodium*. It is transmitted by a bite of a female mosquito of the genus *Anopheles*, mostly present in hot areas. Even though several species of *Plasmodium* exist, only five can cause the disease in humans [86]. Among them, the *P. falciparum* species is associated with a high morbidity and mortality in Africa [87]. Such infections can profoundly affect B-cell metabolism, promoting polyclonal activation and an abnormal production of antibodies. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes express erythrocyte membrane protein 1 (PfEMP1) [88], whose cystein-rich inter-domain region I α can activate B-cells [89]. The *MYC* and *IGH* loci move close to each other in activated B-cells [41, 45], thus the probability of the t(8;14) translocation is increased. Moreover, *P. falciparum* and *P. chabaudi* can induce an aberrant expression of AICDA in germinal center B-cells in both humans and mice [39, 49]. As a consequence, mice chronically infected with *P. chabaudi* exhibit a widespread genomic instability and develop mature B-cell lymphomas [49].

Effects induced on host cells by BL etiological factors

Factor	Effect	Effector	Reference
EBV latency	chromatin remodeling	EBNA-1, EBNA-2, LMP	[58, 59]
	DNA damage via ROS	EBNA-1	[55]
reactivation	epigenetic alteration	EBNA-1, LMP	[66]
	AICDA overexpression	EBNA-3C	[63]
	DNA damage via ROS	Zta	[66, 67]
	premature chromatin condensation	BGLF4 kinase	[68, 70]
HIV	epigenetic alteration	Zta	[66]
	B-cell activation		[34, 79]
	DNA damage via ROS	Tat	[18]
	<i>IGH-MYC</i> colocalization	Tat	[18]
<i>P. falciparum</i>	EBV reactivation	Tat	[34]
	B-cell activation	CIDR1 α	[41]
	AICDA overexpression		[39, 49]
<i>E. tirucalli</i>	EBV reactivation	CIDR1 α	[39, 89-91]
	DNA damage via ROS	latex	[98, 99]
	EBV reactivation		[96, 101]



Also, the memory B cells that are most susceptible to the CIDR1alpha domain-mediated activation often harbor a latent EBV. It has been demonstrated that CIDR1alpha can also induce EBV reactivation and its lytic cycle [89]. Indeed, chronic and repeated exposure to *P. falciparum* leads to virus reactivation from latency, an increased number of latently infected B cells in germinal centers, and elevated EBV viral load [36, 39, 90, 91]. In addition, *P. falciparum* alters the immune surveillance against EBV since exposure to holoendemic malaria induces suppression of EBV-specific T cell immunosurveillance [92, 93] and defects in EBV-specific CD8⁺ T-cell differentiation [94].

***Euphorbia tirucalli*.** *Euphorbia tirucalli*, a plant belonging to the Euphorbiaceae family, is commonly used as an ornamental or hedge plant. It is endemic in African

countries including Angola, Erythrea, Ethiopia, Kenya, Malawi, Mauritius, Rwanda, Senegal, Sudan, Tanzania, Uganda, and Zanzibar [95]. Interestingly, its geographical distribution is very similar to that of the endemic BL [96]. The plant has been frequently observed in houses of BL patients in the Eastern Africa [97], suggesting a possible link with BL pathogenesis. Little evidence exists on a direct role of *E. tirucalli* in modifying the nuclear organization. However, plant extracts have a high genotoxic potential and can increase DNA breakage and oxidative damage in cell cultures of human leukocytes in a dose-dependent manner [98, 99]. *Euphorbia tirucalli* can also alter the nuclear organization in B-cells by activating the EBV lytic cycle, as it contains EBV-activating substances such as 4-deoxyphorbol ester [95-97, 100]. When added to EBV-positive B-lymphocytes, *E. tirucalli* extracts

induced chromosomal abnormalities including ones on chromosome 8 [96, 101]. Finally, B-cells treated with the *E. tirucalli* extracts produced lymphomas when injected into nude mice [97].

Nuclear organization and chromosome positioning in the nuclear space are characteristic features of different cell types. Their modification by biological processes (e.g. epigenetic modifications, presence of DNA breakage) can result in increased risks of oncogenic translocations. In B-cells, recombination events that naturally occur during the processes of maturation and antibody formation can also alter the nuclear organization. These processes are affected by exogenous factors like EBV, HIV-1, the malaria parasites, or *Euphorbia tirucalli*. They can induce deregulation of chromatin-related genes, epigenetic changes, and excessive DNA damage provoking large-scale nuclear remodeling, which can potentially lead to the development of BL-specific translocations. The main changes introduced by each of these factors are summarized in the table and figure. However, knowledge of the exact role(s) played by these factors in the generation of BL-specific translocation and BL oncogenesis is still incomplete. Further studies could help in understanding the mechanisms leading to the Burkitt lymphoma etiopathogenesis.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the ANRS, INSERM (ENVIBURKITT), La Ligue Contre le Cancer (M27231) to Y.S.V. and the Russian Science Foundation (14-24-00022) to O.V.I.; A.P.K. was a recipient of a FEBS fellowship.

REFERENCES

- Cremer, M., Von Hase, J., Volm, T., Brero, A., Kreth, G., Walter, J., Ficher, C., Späwe, I., Cremer, C., and Cremer, T. (2001) Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells, *Chromosome Res.*, **9**, 541-567.
- Parada, L. A., McQueen, P. G., and Misteli, T. (2004) Tissue-specific spatial organization of genomes, *Genome Biol.*, **5**, 44.
- Lin, C., Yang, L., and Rosenfeld, M. G. (2012) Molecular logic underlying chromosomal translocations, random or non-random? *Adv. Cancer Res.*, **113**, 241-279.
- Chen, B., Yusuf, M., Hashimoto, T., Estandarte, A. K., Thompson, G., and Robinson, I. (2017) Three-dimensional positioning and structure of chromosomes in a human prophase nucleus, *Sci. Adv.*, **3**, e1602231.
- Croft, J. A., Bridger, J. M., Boyle, S., Perry, P., Teague, P., and Bickmore, W. A. (1999) Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus, *J. Cell Biol.*, **145**, 1119-1131.
- Cavalli, G., and Misteli, T. (2013) Functional implications of genome topology, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 290-299.
- Meaburn, K. J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007) Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations, *Semin. Cancer Biol.*, **17**, 80-90.
- Fanucchi, S., Shibayama, Y., Burd, S., Weinberg, M. S., and Mhlanga, M. M. (2013) Chromosomal contact permits transcription between coregulated genes, *Cell*, **155**, 606-620.
- Therizols, P., Illingworth, R. S., Courilleau, C., Boyle, S., Wood, A. J., and Bickmore, W. A. (2014) Chromatin decondensation is sufficient to alter nuclear organization in embryonic stem cells, *Science*, **346**, 1238-1242.
- Gonzalez-Sandoval, A., Towbin, B. D., Kalck, V., Cabianca, D. S., Gaidatzis, D., Hauer, M. H., Geng, L., Wang, L., Yang, T., Wang, X., Zhao, K., and Gasser, S. M. (2015) Perinuclear anchoring of H3K9-methylated chromatin stabilizes induced cell fate in *C. elegans* embryos, *Cell*, **163**, 1333-1347.
- Bonev, B., and Cavalli, G. (2016) Organization and function of the 3D genome, *Nat. Rev. Genet.*, **17**, 661-678.
- Jakob, B., Splinter, J., Durante, M., and Taucher-Scholz, G. (2009) Live cell microscopy analysis of radiation-induced DNA double-strand break motion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3172-3177.
- Krawczyk, P. M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J. P., Kanaar, R., Franken, N. A., and Aten, J. A. (2012) Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks, *J. Cell Sci.*, **125**, 2127-2133.
- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B. D., and Gasser, S. M. (2012) Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery, *Nat. Cell Biol.*, **14**, 502-509.
- Roukos, V., Voss, T. C., Schmidt, C. K., Lee, S., Wangsa, D., and Misteli, T. (2013) Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells, *Science*, **341**, 660-664.
- Kruhlak, M. J., Celeste, A., Deltre, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W. G., McNally, J. G., Bazett-Jones, D. P., and Nussenzweig, A. (2006) Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks, *J. Cell Biol.*, **172**, 823-834.
- Aten, J. A., Stap, J., Krawczyk, P. M., van Oven, C. H., Hoebe, R. A., Essers, J., and Kanaar, R. (2004) Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains, *Science*, **303**, 92-95.
- Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O. V., Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., Boutboul, D., Raphael, M., Wiels, J., Razin, S. V., Bury-Mone, S., Oksenhendler, E., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2017) HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells, *Leukemia*, **31**, 2515-2522.
- Roukos, V., and Misteli, T. (2014) The biogenesis of chromosome translocations, *Nat. Cell Biol.*, **16**, 293-300.
- Roukos, V., Burman, B., and Misteli, T. (2013) The cellular etiology of chromosome translocations, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25**, 357-364.
- Burman, B., Zhang, Z. Z., Pegoraro, G., Lieb, J. D., and Misteli, T. (2015) Histone modifications predispose genome regions to breakage and translocation, *Genes Dev.*, **29**, 1393-1402.
- Daniel, J. A., and Nussenzweig, A. (2012) Roles for histone H3K4 methyltransferase activities during immunoglobulin

- class-switch recombination, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 733-738.
23. Shimazaki, N., Tsai, A. G., and Lieber, M. R. (2009) H3K4me3 stimulates the V(D)J RAG complex for both nicking and hairpinning in trans in addition to tethering *in cis*: implications for translocations, *Mol. Cell*, **34**, 535-544.
 24. Chiarle, R., Zhang, Y., Frock, R. L., Lewis, S. M., Molinie, B., Ho, Y. J., Myers, D. R., Choi, V. W., Compagno, M., Malkin, D. J., Neuberg, D., Monti, S., Giallourakis, C. C., Gostissa, M., and Alt, F. W. (2011) Genome-wide translocation sequencing reveals mechanisms of chromosome breaks and rearrangements in B-cells, *Cell*, **147**, 107-119.
 25. Mathas, S., Kreher, S., Meaburn, K. J., Johrens, K., Lamprecht, B., Assaf, C., Sterry, W., Kadin, M. E., Daibata, M., Joos, S., Hummel, M., Stein, H., Janz, M., Anagnostopoulos, I., Schrock, E., and Misteli, T. (2009) Gene deregulation and spatial genome reorganization near breakpoints prior to formation of translocations in anaplastic large cell lymphoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 5831-5836.
 26. Klein, I. A., Resch, W., Jankovic, M., Oliveira, T., Yamane, A., Nakahashi, H., Di Virgilio, M., Bothmer, A., Nussenzweig, A., Robbiani, D. F., Casellas, R., and Nussenzweig, M. C. (2011) Translocation-capture sequencing reveals the extent and nature of chromosomal rearrangements in B-lymphocytes, *Cell*, **147**, 95-106.
 27. Mathas, S., and Misteli, T. (2009) The dangers of transcription, *Cell*, **139**, 1047-1049.
 28. Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., Ju, B., Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D. W., Fu, X. D., Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2009) Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer, *Cell*, **139**, 1069-1083.
 29. Deaton, A., and Bird, A. (2011) CpG islands and the regulation of transcription, *Genes Dev.*, **25**, 1010-1022.
 30. Tsai, A. G., Lu, H., Raghavan, S. C., Muschen, M., Hsieh, C. L., and Lieber, M. R. (2008) Human chromosomal translocations at CpG sites and a theoretical basis for their lineage and stage specificity, *Cell*, **135**, 1130-1142.
 31. Nambiar, M., and Raghavan, S. C. (2011) How does DNA break during chromosomal translocations? *Nucleic Acids Res.*, **39**, 5813-5825.
 32. Clapier, C. R., Iwasa, J., Cairns, B. R., and Peterson, C. L. (2017) Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 407-422.
 33. Neumann, F. R., Dion, V., Gehlen, L. R., Tsai-Pflugfelder, M., Schmid, R., Taddei, A., and Gasser, S. M. (2012) Targeted INO80 enhances subnuclear chromatin movement and ectopic homologous recombination, *Genes Dev.*, **26**, 369-383.
 34. Bornkamm, G. W. (2009) Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers, *Int. J. Cancer*, **124**, 1745-1755.
 35. Mawson, A. R., and Majumdar, S. (2017) Malaria, Epstein-Barr virus infection, and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma, *Int. J. Cancer*, **141**, 1849-1855.
 36. Moormann, A. M., and Bailey, J. A. (2016) Malaria – how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis, *Curr. Opin. Virol.*, **20**, 78-84.
 37. Brady, G., MacArthur, G. J., and Farrell, P. J. (2007) Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma, *J. Clin. Pathol.*, **60**, 1397-1402.
 38. Allday, M. J. (2009) How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of *myc* in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin. Cancer Biol.*, **19**, 366-376.
 39. Torgbor, C., Awuah, P., Deitsch, K., Kalantari, P., Duca, K. A., and Thorley-Lawson, D. A. (2014) A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis, *PLoS Pathog.*, **10**, e1004170.
 40. Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E., and Adams, J. M. (1983) Sequence of the murine and human cellular *myc* oncogenes and two modes of *myc* transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours, *EMBO J.*, **2**, 2375-2383.
 41. Sklyar, I., Iarovaia, O. V., Gavrillo, A. A., Pichugin, A., Germini, D., Tsfasman, T., Caron, G., Fest, T., Lipinski, M., Razin, S. V., and Vassetzky, Y. S. (2016) Distinct patterns of colocalization of the *CCND1* and *CMYC* genes with their potential translocation partner *IGH* at successive stages of B-cell differentiation, *J. Cell. Biochem.*, **117**, 1506-1510.
 42. Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klibi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Saada, Y., Dib, C., Dmitriev, P., Hamade, A., and Carnac, G. (2014) Perinucleolar relocation and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma, *Blood*, **123**, 2044-2053.
 43. Roix, J. J., McQueen, P. G., Munson, P. J., Parada, L. A., and Misteli, T. (2003) Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas, *Nat. Genet.*, **34**, 287-291.
 44. Nikiforova, M. N., Stringer, J. R., Blough, R., Medvedovic, M., Fagin, J. A., and Nikiforov, Y. E. (2000) Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cell, *Science*, **290**, 138-141.
 45. Osborne, C. S., Chakalova, L., Mitchell, J. A., Horton, A., Wood, A. L., Bolland, D. J., Corcoran, A. E., and Fraser, P. (2007) *Myc* dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by *IGH*, *PLoS Biol.*, **5**, e192.
 46. Pichugin, A., Iarovaia, O. V., Gavrillo, A., Sklyar, I., Barinova, N., Barinov, A., Ivashkin, E., Caron, G., Aoufouchi, S., Razin, S. V., Fest, T., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. S. (2017) The *IGH* locus relocates to a "recombination compartment" in the perinucleolar region of differentiating B-lymphocytes, *Oncotarget*, **8**, 16941.
 47. Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M. C. (2004) AID is required for *c-myc/IGH* chromosome translocations *in vivo*, *Cell*, **118**, 431-438.
 48. Robbiani, D. F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D. J., Chen, H. T., Corcoran, A. E., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M. C. (2008) AID is required for the chromosomal breaks in *c-myc* that lead to *c-myc/IGH* translocations, *Cell*, **135**, 1028-1038.
 49. Robbiani, D. F., Deroubaix, S., Feldhahn, N., Oliveira, T. Y., Callen, E., Wang, Q., Jankovic, M., Silva, I. T., Rommel, P. C., Bosque, D., and Eisenreich, T. (2015) Plasmodium infectio promotes genomic instability and AID-dependent B-cell lymphoma, *Cell*, **162**, 727-737.

50. Rocha, P. P., Micsinai, M., Kim, J. R., Hewitt, S. L., Souza, P. P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J. A. (2012) Close proximity to *IGH* is a contributing factor to AID-mediated translocations, *Mol. Cell*, **47**, 873-885.
51. Epstein, M. A. (1965) Morphological and biological studies on a virus in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma, *J. Exp. Med.*, **121**, 761-770.
52. Amon, W., and Farrell, P. J. (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency, *Rev. Med. Virol.*, **15**, 149-156.
53. Li, C., Shi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Liu, A., Jin, Y., Lukasova, E., Kozubek, S., Kozubek, M., Kjeronska, J., Ryznar, L., Horakova, J., and Krahulcova, E. (2010) Dynamic changes of territories 17 and 18 during EBV-infection of human lymphocytes, *Mol. Biol. Rep.*, **37**, 2347-2354.
54. Kamranvar, S. A., Gruhne, B., Szeles, A., and Masucci, M. G. (2007) Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma, *Oncogene*, **26**, 5115-5123.
55. Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S., Gastaldello, S., and Masucci, M. (2009) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2313-2318.
56. Young, L. S., and Rickinson, A. B. (2004) Epstein-Barr virus: 40 years on, *Nat. Rev. Cancer*, **4**, 757-768.
57. Sivachandran, N., Wang, X., and Frappier, L. (2012) Functions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein in viral reactivation and lytic infection, *J. Virol.*, **86**, 6146-6158.
58. Sompallae, R., Callegari, S., Kamranvar, S. A., and Masucci, M. G. (2010) Transcription profiling of Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)-1 expressing cells suggests targeting of chromatin remodeling complexes, *PLoS One*, **5**.
59. Coppotelli, G., Mughal, N., Callegari, S., Sompallae, R., Caja, L., Luijsterburg, M. S., Dantuma, N. P., Moustakas, A., and Masucci, M. G. (2013) The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 reprograms transcription by mimicry of high mobility group A proteins, *Nucleic Acids Res.*, **41**, 2950-2962.
60. Wu, D. Y., Kalpana, G. V., Goff, S. P., and Schubach, W. H. (1996) Epstein-Barr virus nuclear protein 2 (EBNA2) binds to a component of the human SNF-SWI complex, *J. Virol.*, **70**, 6020-6028.
61. Wood, C. D., Veenstra, T., Khasnis, S., Gunnell, A., Webb, H. M., Shannon-Lowe, C., Andrews, S., Osborne, C. S., and West, M. J. (2016) *Myc* activation and *BCL2L1* silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs, *Elife*, **5**, e18270.
62. Chen, A., Zhao, B., Kieff, E., Aster, J. C., and Wang, F. (2006) EBNA-3B- and EBNA-3C-regulated cellular genes in Epstein-Barr virus-immortalized lymphoblastoid cell lines, *J. Virol.*, **80**, 10139-10150.
63. Kalchschmidt, J. S., Bashford-Rogers, R., Paschos, K., Gillman, A. C. T., Styles, C. T., Kellam, P., and Alldae, M. J. (2016) Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C directly induces expression of AID and somatic mutations in B-cells, *J. Exp. Med.*, **213**, 921-928.
64. Leonard, S., Wei, W., Anderton, J., Vockerodt, M., Rowe, M., Murray, P. G., and Woodman, C. B. (2011) Epigenetic and transcriptional changes which follow Epstein-Barr virus infection of germinal center B-cells and their relevance to the pathogenesis of Hodgkin's lymphoma, *J. Virol.*, **85**, 9568-9577.
65. Chang, Y. N., Dong, D. L., Hayward, G. S., and Hayward, S. D. (1990) The Epstein-Barr virus Zta transactivator: a member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif, *J. Virol.*, **64**, 3358-3369.
66. Kgtle, M. M., Spearman, C. W., Kalla, A. A., and Hairwadzi, H. N. (2017) DNA oncogenic virus-induced oxidative stress, genomic damage, and aberrant epigenetic alterations, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 3179421.
67. Chen, X., Kamranvar, S. A., and Masucci, M. G. (2016) Oxidative stress enables Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation by posttranscriptional regulation of viral and cellular growth-promoting factors, *Oncogene*, **35**, 3807-3816.
68. Chiu, Y. F., Sugden, A. U., and Sugden, B. (2013) Epstein-Barr viral productive amplification reprograms nuclear architecture, DNA replication, and histone deposition, *Cell Host Microbe*, **14**, 607-618.
69. Asai, R., Kato, A., Kato, K., Kanamori-Koyama, M., Sugimoto, K., Sairenji, T., Nishiyama, Y., and Kawaguchi, Y. (2006) Epstein-Barr virus protein kinase BGLF4 is a virion tegument protein that dissociates from virions in a phosphorylation-dependent process and phosphorylates the viral immediate-early protein BZLF1, *J. Virol.*, **80**, 5125-5134.
70. Lee, C.-P., Chen, J.-Y., Wang, J.-T., Kimura, K., Takemoto, A., Lu, C.-C., and Chen, M. R. (2007) Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II, *J. Virol.*, **81**, 5166-5180.
71. Achkar, E., Gerbault-Seureau, M., Muleris, M., Dutrillaux, B., and Debatisse, M. (2005) Premature condensation induces breaks at the interface of early and late replicating chromosome bands bearing common fragile sites, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 18069-18074.
72. Moquin, S. A., Thomas, S., Whalen, S., Warburton, A., Fernandez, S. G., McBride, A. A., Katherine, S., Pollard, J. J., and Miranda, L. (2017) The Epstein-Barr virus episome maneuvers between nuclear chromatin compartments during reactivation, *J. Virol.*, doi: 10.1128/JVI.01413-17.
73. Hurley, E., Agger, S., McNeil, J., Lawrence, J. B., Calendar, A., Lenoir, G., and Thorley-Lawson, D. A. (1991) When Epstein-Barr virus persistently infects B-cell lines, it frequently integrates, *J. Virol.*, **65**, 1245-1254.
74. Xiao, K., Yu, Z., Li, X., Li, X., Tang, K., Tu, C., Qi, P., Liao, Q., Chen, P., Zeng, Z., Li, G., and Xiong, W. (2016) Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus (EBV) integration and strain in C666-1 and Raji cells, *J. Cancer*, **7**, 214-224.
75. Nunnari, G., Smith, J. A., and Daniel, R. (2008) HIV-1 Tat and AIDS-associated cancer: targeting the cellular anti-cancer barrier? *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **27**, 3.
76. Musinova, Y. R., Sheval, E. V., Dib, C., Germini, D., and Vassetzky, Y. S. (2016) Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus, *Cell. Mol. Life Sci.*, **73**, 589-601.
77. Gibson, T. M., Morton, L. M., Shiels, M. S., Clarke, C. A., and Engels, E. A. (2014) Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: a population-based study, *AIDS*, **28**, 2313-2318.
78. Mutalima, N., Molyneux, E., Jaffe, H., Kamiza, S., Borgstein, E., Mkandawire, N., Liomba, G., Batumba, M., Lagos, D., Gratrix, F., Boshoff, C., Casabonne, D., Carpenter, L. M., and Newton, R. (2008) Associations

- between Burkitt lymphoma among children in Malawi and infection with HIV, EBV and malaria: results from a case-control study, *PLoS One*, **3**, e2505.
79. Dolcetti, R., Gloghini, A., Caruso, A., and Carbone, A. (2016) A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood*, **127**, 1403-1409.
 80. Robbiani, D. F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., Klein, I. A., Stone, G., Eisenreich, T. R., Ried, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M. C. (2009) AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations, *Mol. Cell*, **36**, 631-641.
 81. Sneller, M., and Lane, H. (2014) HIV/IL-2 and EBV-associated lymphoproliferative diseases: cause and effect or coincidence? *HIV Med.*, **15**, 1-2.
 82. Mbulaiteye, S. M., Biggar, R. J., Goedert, J. J., and Engels, E. A. (2003) Immune deficiency and risk for malignancy among persons with AIDS, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **32**, 527-533.
 83. Engels, E. A., Pfeiffer, R. M., Landgren, O., and Moore, R. D. (2010) Immunologic and virologic predictors of AIDS-related non-Hodgkin lymphoma in the highly active antiretroviral therapy era, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, **54**, 78-84.
 84. El-Amine, R., Germini, D., Zakharova, V. V., Tsfasman, T., Sheval, E. V., Louzada, R. A. N., Dupuy, C., Bilhou-Nabera, C., Hamade, A., Najjar, F., Oksenhendler, E., Lipinski, M., Chernyak, B. V., and Vassetzky, Y. S. (2017) HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production, *Redox Biol.*, in press.
 85. Rochford, R., and Moormann, A. M. (2015) Burkitt's lymphoma, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **390**, 267-285.
 86. Singh, B., Sung, L. K., Matusop, A., Radhakrishnan, A., Shamsul, S. G., Cox-Singh, J., Thomas, A., and Conway, D. J. (2004) A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings, *Lancet*, **363**, 1017-1024.
 87. Petter, M., and Duffy, M. F. (2015) *Pathogen–Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations*, (Hsu, E., and Du Pasquier, L., eds.) Springer.
 88. Biggs, B., Anders, R. F., Dillon, H. L., Davern, K. M., Martin, M., Petersen, C., Carlson, J., Helmby, H., Hill, A. V. S., Brewster, D., Greenwood, B. M., and Wahlgren, M. (1992) Adherence of infected erythrocytes to venular endothelium selects for antigenic variants of *Plasmodium falciparum*, *J. Immunol.*, **149**, 2047-2054.
 89. Chyne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A. O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K., Iorem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M. T. (2007) A molecular link between malaria and Epstein–Barr virus reactivation, *PLoS Pathog.*, **3**, e80.
 90. Reynaldi, A., Schlub, T. E., Chelimo, K., Sumba, P. O., Piriou, E., Ogolla, S., Moormann, A. M., Rochford, R., and Davenport, M. P. (2016) Impact of plasmodium falciparum coinfection on longitudinal Epstein–Barr virus kinetics in kenyan children, *J. Infect. Dis.*, **213**, 985-991.
 91. Moormann, A. M., Chelimo, K., Sumba, O. P., Lutzke, M. L., Ploutz-Snyder, R., Newton, D., Kazura, J., and Rochford, R. (2005) Exposure to holoendemic malaria results in elevated Epstein–Barr virus loads in children, *J. Infect. Dis.*, **191**, 1233-1238.
 92. Moormann, A. M., Chelimo, K., Sumba, P. O., Tisch, D. J., Rochford, R., and Kazura, J. W. (2007) Exposure to holoendemic malaria results in suppression of Epstein–Barr virus-specific T cell immunosurveillance in Kenyan children, *J. Infect. Dis.*, **195**, 799-808.
 93. Njie, R., Bell, A. I., Jia, H., Croom-Carter, D., Chaganti, S., Hislop, A. D., Whittle H., and Rickinson, A. B. (2009) The effects of acute malaria on Epstein–Barr virus (EBV) load and EBV-specific T-cell immunity in Gambian children, *J. Infect. Dis.*, **199**, 31-38.
 94. Chattopadhyay, P. K., Chelimo, K., Embury, P. B., Mulama, D. H., Sumba, P. O., Gostick, E., Ladell, K., Brodie, T. M., Vulule, J., Roederer, M., Moormann, A. M., and Prece, D. A. (2013) Holoendemic malaria exposure is associated with altered Epstein–Barr virus-specific CD8⁺ T-cell differentiation, *J. Virol.*, **87**, 1779-1788.
 95. Gupta, N., Vishnoi, G., Wal, A., and Wal, P. (2013) Medicinal value of *Euphorbia tirucalli*, *Syst. Rev. Pharm.*, **4**, 40.
 96. Mannucci, S., Luzzi, A., Carugi, A., Gozzetti, A., Lazzi, S., Malagnino, V., Monique, S., Cusi, M. G., Leoncini, L., Van den Bosch, C. A., and De Falco, G. (2012) EBV reactivation and chromosomal polysomies: *Euphorbia tirucalli* as a possible cofactor in endemic Burkitt lymphoma, *Adv. Hematol.*, 149780.
 97. Van den Bosch, C., Griffin, B. E., Kazembe, P., Dziweni, C., and Kadzamira, L. (1993) Are plant factors a missing link in the evolution of endemic Burkitt's lymphoma? *Br. J. Cancer*, **68**, 1232-1235.
 98. Machado, M. M., De Oliveira, L. F. S., Zuravski, L., De Souza, R. O., Fischer, P., Duarte, J. A., Jonathaline, A., Manoelly, O. R., Camila, M. G., Boligon, A. A., and Margareth, A. L. (2016) Evaluation of genotoxic and cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of *Euphorbia tirucalli* (Euphorbiaceae) in cell cultures of human leukocytes, *An. Acad. Bras. Cienc.*, **88**, 17-28.
 99. Waczuk, E., Kamdem, J., Ablaji, A., Meinerz, D., Bueno, D., Do Nascimento Gonzaga, T., Scotti do Canto Dorow, S., Boligon, A. A., Athayde, M. L., and Avila, D. S. (2015) *Euphorbia tirucalli* aqueous extract induces cytotoxicity, genotoxicity and changes in antioxidant gene expression in human leukocytes, *Toxicol. Res. (Camb.)*, **4**, 739-748.
 100. MacNeil, A., Sumba, O. P., Lutzke, M. L., Moormann, A., and Rochford, R. (2003) Activation of the Epstein–Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*, *Br. J. Cancer*, **88**, 1566-1569.
 101. Aya, T., Kinoshita, T., Imai, S., Koizumi, S., Mizuno, F., Osato, T., Saton, C., Oikawa, T., Kuzumaki, N., and Ohigashi, H. (1991) Chromosome translocation and *c-MYC* activation by Epstein–Barr virus and *Euphorbia tirucalli* in B lymphocytes, *Lancet*, **337**, 1190.

En conclusion de ce deuxième chapitre, nous pouvons retenir que trois conditions sont requises pour la formation de translocations chromosomique :

- Une cassure double brin d'ADN simultanée sur les deux chromosomes partenaires de translocation. Ces CDBs peuvent être de diverses origines, mais dans les lymphocytes B en particulier, nous retiendrons celles médiées par les enzymes RAG1/2 et AID au cours des processus de recombinaison V(D)J, SHM et CSR lors du développement et de la maturation des cellules B. Ces enzymes ciblent des régions spécifiques des gènes d'immunoglobulines (*IGH*, *IGK* et *IGL*) mais peuvent dans certaines situations cibler d'autres loci y compris *MYC*.
- Une recombinaison non homologue des deux bouts de cassure ; et parmi les trois principales voies qui existent pour réparer les CDBs, la voie alternative du NHEJ est celle la plus associée aux translocations chromosomiques.
- Enfin, une proximité spatiale entre les deux partenaires apparaît indispensable pour que la recombinaison puisse se faire. Vu l'organisation spatiale du génome, un remodelage de l'architecture nucléaire est nécessaire pour amener deux loci normalement distants à proximité l'un de l'autre. Ce remodelage pouvant être une conséquence des CDBs elles-mêmes et de leur réparation ; ou celle d'autres processus physiologiques (transcription, cycle cellulaire...) ou pathologiques (cancers, infection virale) qui relocalisent des loci en dehors de leur territoire. Dans la revue présentée ici, nous avons montré que des virus comme EBV et VIH, le *Plasmodium falciparum* ou le latex de la plante *Euphorbia tirucalli* peuvent directement ou indirectement perturber l'architecture nucléaire des lymphocytes B. Cependant il existe très peu de données sur leur rôle direct dans la formation de la t(8 ;14) du LB. EBV et VIH seront traités plus en détail respectivement dans les chapitres 3 et 4. *Plasmodium falciparum* et *Euphorbia tirucalli* seront abordés le chapitre 5 dédié au Lymphome de Burkitt.

3. Virus Epstein-Barr

Dans ce chapitre nous verrons d'abord la définition et la taxonomie du virus EBV, puis les propriétés de ce virus incluant l'organisation de son génome, les produits codés par ce génome et leurs fonctions, le cycle biologique de ce virus avec ses deux phases de latence et lytique. Nous avons ensuite fait un bref aperçu sur l'épidémiologie variable de ce virus selon les zones géographiques et la souche virale avant de terminer par les pathologies associées et les mécanismes d'oncogenèse décrits pour le virus EBV.

3.1. Définition et classification	64
3.2. Propriétés du virus EBV	64
3.2.1. Structure	64
3.2.1.1. Génome du virus	65
3.2.1.2. Produits des gènes viraux et fonctions protéiques	66
3.2.2. Cycle biologique	70
3.2.2.1. Contamination	70
3.2.2.2. Cellules cibles	71
3.2.2.3. Cycle de vie dans les lymphocytes B	71
3.3. Epidémiologie	75
3.4. Pathologies associées	76
3.5. Oncogenèse liée au virus EBV	78
3.5.1. Effets oncogènes des protéines de latence et des transcrits non-codant	79
3.5.2. Effets oncogènes des protéines du cycle lytique	84
3.6. Article 2: Oncogenic properties of the EBV Zebra protein	85

3.1. Définition et classification

EBV, également connu sous le nom de herpèsvirus humain de type 4 est un virus à ADN décrit pour la première fois en 1964 par Michel Anthony Epstein et Yvonne Barr à partir de biopsies de LBe, faisant ainsi de lui le premier virus humain oncogène (Epstein et al., 1964, 1965). Il appartient à la famille des Herpesviridae, à la sous-famille des *Gammaherpesvirinae* et au genre *Lymphocryptovirus* (Tableau I). Deux sous-types sont décrits pour le virus EBV : type1 (ou type A) et type 2 (ou type B) (Dambaugh et al., 1980; Sample et al., 1990) (voir plus loin). EBV est l'agent responsable de la mononucléose infectieuse (MI) et possède comme tous les herpèsvirus, la particularité de persister à vie dans les lymphocytes B infectés sous forme latente, se réactivant dans certaines conditions (Hjalgrim et al., 2007; Rochford, 2016; Thorley-Lawson, 2005).

Tableau I: Classification des Herpèsvirus

Sous famille	Nom Taxonomique	Nom commun	Genre
Alphaherpesvirinae	HHV-1	Herpès Simplex type 1 (HSV-1)	Simplexvirus
	HHV-2	Herpès Simplex type 2 (HSV-2)	Simplexvirus
	HHV-3	Varicelle Zona Virus (VZV)	Varicellovirus
Betaherpesvirinae	HHV-5	Cytomégalovirus (CMV)	Cytomegalovirus
	HHV-6	Herpès Virus Humain 6	Roseolovirus
	HHV-7	Herpès Virus Humain 7	Roseolovirus
Gammaherpesvirinae	HHV-4 HHV-8	Epstein-Barr Virus (EBV) KSHV	Lymphocryptovirus Rhadinovirus

HHV = Herpès Virus Humain ; KSHV = Herpès virus associé au Sarcome de Kaposi

3.2. Propriétés du virus EBV

3.2.1. Structure

Comme tous les herpèsvirus humain, EBV, d'un diamètre de 150nm environ, est un virus à ADN linéaire double brin, protégé par une nucléocapside icosaédrique, très antigénique, contenant 162 capsomères et entourée par un tégument. Le virus est enveloppé par une bicouche phospholipidique qui dérive des membranes de la cellule hôte et dans laquelle sont insérées des glycoprotéines d'enveloppe représentées en majorité par la gp350/220 (Figure 13).

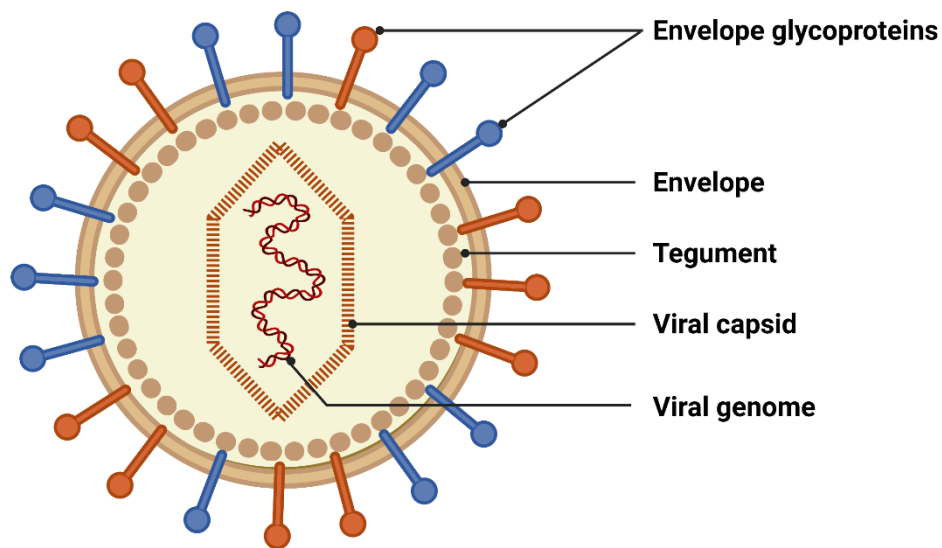


Figure 13 : Schéma représentatif de la structure du virus EBV

3.2.1.1. Génome du virus

Deux types de virus EBV sont reconnus : EBV type 1 (ou type A) dont le prototype est la souche B95-8 et EBV type 2 (ou type B) dont le prototype es la souche AG876 (Sample et al., 1990). La souche B95-8 provient d'un patient Nord-américain atteint de mononucléose infectieuse (Miller et al., 1972) et la souche AG876 a été isolée d'un patient ghanéen atteint de LB (Dolan et al., 2006). Cette distinction repose sur le polymorphisme des séquences codantes des protéines EBNA2 et EBNA3s (Sample et al., 1990). D'autres sous-variants mutant du génome EBV impliquant des gènes de latence ou du cycle lytique sont décrits (Farrell, 2015; Palser et al., 2015) mais ne seront pas détaillés.

La séquence de la souche B95-8 était au début considérée comme séquence de référence mais en 1980, Raab-Traub et ses collaborateurs ont montré que ce prototype était en réalité le résultat d'une délétion inhabituelle de la souche sauvage d'environ 12kb (Raab-Traub et al., 1980). La séquence complète de la souche B-95 a été publiée pour la première fois en 1984 (Baer et al., 1984) et six années plus tard la séquence de la délétion a été identifiée à partir de la lignée cellulaire de LB, Raji permettant ainsi de compléter la séquence entière de la souche sauvage d'EBV (Parker et al., 1990)

Le génome d'EBV est ainsi constitué par un ADN linéaire de 172 kilopaires de bases (kb) et code pour environ une centaine de protéines. Dans le virion, le génome est linéaire et organisé en 5 domaines uniques de U1 à U5. Le domaine U1 constitue la séquence unique courte (US = *Unique Short*) et les domaines U2, U3, U4 et U5 constituent la séquence unique longue (UL = *Unique Long*). Les domaines uniques sont séparés par des séquences internes répétées en tandem IR1 à 4 (*Internal repeat*) dont la plus importante est l'IR1 constituée de 7 à 12 séquences répétées. A chaque extrémité du génome se trouvent des séquences répétées terminales (TR = *Terminal repeat*) qui permettent la circularisation du génome sous forme d'épisode dans les cellules infectées. Le génome comprend une origine de réplication latente (OriP) et deux origines de réplication lytique (OriLyt). OriP est située au niveau de la séquence US et permet la réplication du génome viral au cours de la division de la cellule hôte et le maintien du virus sous forme épisomale durant la latence. Les deux OriLyt sont situées au niveau de séquences appelées DL et DR (*Duplicated Sequence Left and Right*), à proximité des séquences IR2 et IR4 (Figure 14 A-B).

Le séquençage complet du génome a permis d'identifier une centaine de cadres ouverts de lecture (*Open Reading Frame* = *ORF*) répertoriés en fonction des fragments obtenus après digestion par l'enzyme de restriction BAMH1. Les fragments ont été classés par ordre de taille décroissante de A à Z puis de a à h. Chaque région codante est nommée en fonction du fragment de restriction BAMH1 dans lequel il est situé, du sens de lecture (L = *Leftward* ou R = *Rightward*) et du numéro du cadre de lecture (*Frame*). Par exemple BZLF1 correspond au 1^{er} cadre de lecture (frame 1 = F1) transcrit vers la gauche et situé au niveau du fragment Z de restriction BAMH1 (Figure 14C). Quatre promoteurs de latence permettent de contrôler la transcription des gènes de latence et sont désignés selon le fragment de restriction BAMH1 dans lequel ils sont positionnés : Cp, Wp, Qp et Fp.

3.2.1.2. Produits des gènes viraux et fonctions protéiques

EBV code pour une centaine de gènes codant pour des protéines répartis en protéines de latence et en protéines du cycle lytique. EBV code en plus pour des ARN non codants et des microARN (miARN) impliqués dans divers processus cellulaires.

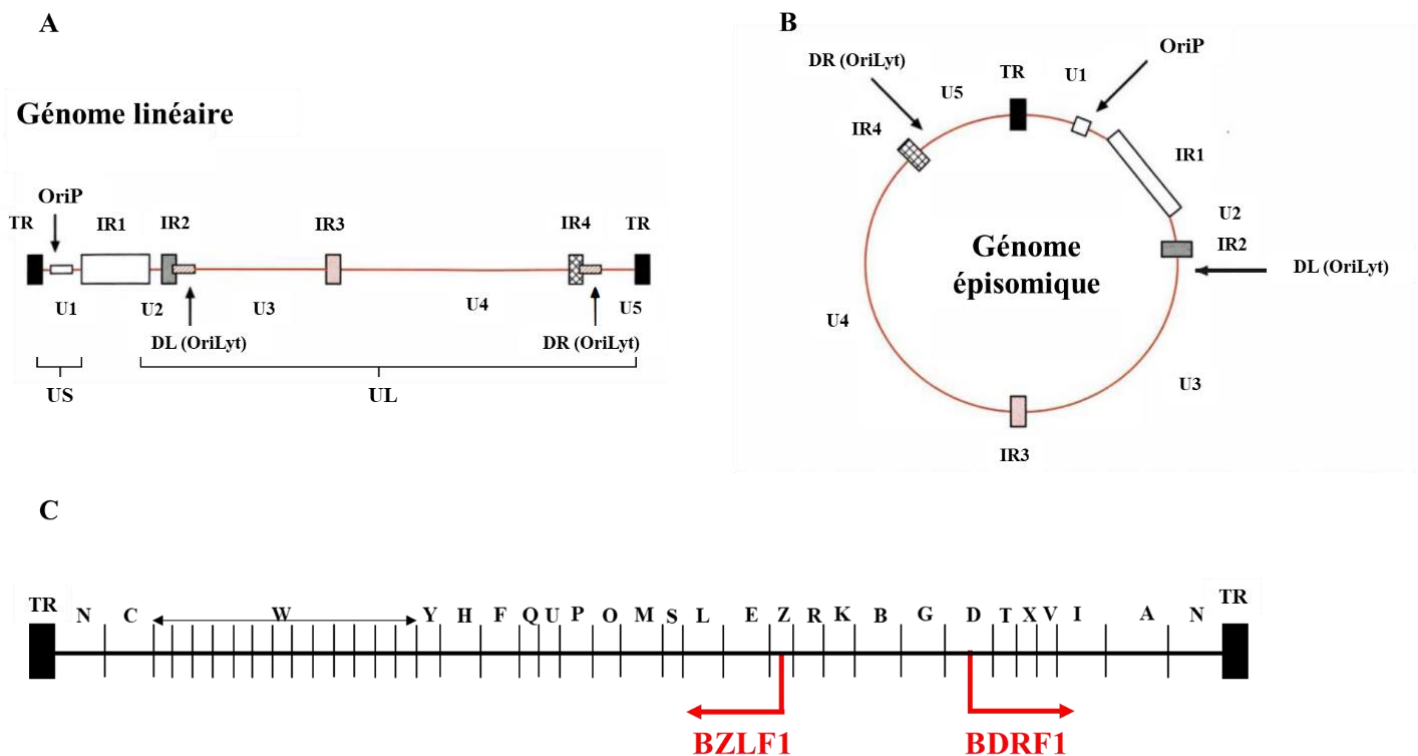


Figure 14: Organisation du génome d'EBV

(A) Représentation schématique du génome linéaire d'EBV observé au cours de l'infection lytique ; (B) Représentation schématique la forme épisomale du génome d'EBV observée au cours de la latence ; (C) Nomenclature des cadres ouverts de lecture (ORF) après digestion par l'enzyme de restriction BAMH1. (A et B) adaptés de (Marelle et al., 1993).

⇒ *Les protéines de latence*

Elles sont au nombre de 9 : 6 protéines nucléaires EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1, 2, 3A, 3B, 3C et 3LP) et 3 protéines membranaires LMP (Latent Membrane Protein 1, 2A et 2B). Ces protéines, exprimées de manières séquentielles à différentes étapes du cycle définissent plusieurs types de latence 0, I, II et III (voir cycle de vie du virus) et sont indispensables à l'immortalisation des cellules infectées et au maintien de la latence virale. Le tableau II répertorie les différentes protéines de latence et leurs principales fonctions au cours de l'infection virale.

Tableau II: Protéines de Latence du virus EBV et leurs fonctions

(Bahri, 2018; Seigneurin et al., 2006; Voirin, 2017)

ORF	Nom commun	Type de latence	Fonction
BKRF1	EBNA1	I, II, III	- Maintien et réplication de l'épisome viral
BYRF1	EBNA2	III	- Immortalisation des lyB - Activateur de transcription cellulaire et viral - Liaison et activation d'EBNA-LP
BERF1/BLRF3	EBNA3A ou EBNA3	III	- Répresseur de l'action d'EBNA2 - Participe à l'immortalisation des lyB - Régulateur transcriptionnel
BERF2	EBNA3B ou EBNA4	III	- Fonction inconnue
BERF3/4	EBNA3C ou EBNA6	III	- Répresseur de l'action d'EBNA2 - Régulateur transcriptionnel - Participe à l'immortalisation des lyB
BWRF1	EBNALP ou EBNA5	III	- Cofacteur d'EBNA2
BNLF1	LMP1	II, III	- Survie des lyB - Induction de Bcl2 (anti-apoptose)
BNRF1	LMP2A ou TP1	II, III	- Inhibition de la réactivation virale
BNRF1	LMP2B ou TP2	II, III	- Inconnue

EBNA = Epstein-Barr Nuclear Antigen; LMP = Latent Membran Protein; lyB = Lymphocyte B; TP = Terminal Protein

⇒ **Les protéines du cycle lytique**

Près de 80 protéines du cycle lytique sont décrites, réparties en protéines très précoces (IE = *immediate early*), précoces (E = *early*) et tardifs (L = *late*).

Les protéines IE sont essentiellement représentées par les deux protéines transactivatrices Zebra (codée par le gène *BZLF1*) et Rta (codée par le gène *BRLF1*) sous le contrôle respectif des promoteurs Zp et Rp. Elles sont les premières à être exprimées et déclenchent le « switch » phase de latence – cycle lytique (Countryman and Miller, 1985; Grogan et al., 1987). Les protéines précoces sont essentiellement constituées par les enzymes nécessaires à la réplication virale et les protéines tardives représentent les protéines de structures du virus (capside, téguments, enveloppe, glycoprotéines membranaires) (Tableau III) (IARC, 1997; Seigneurin et al., 2006; Sergeant et al., 2008; Voirin, 2017).

Tableau III: Quelques protéines du cycle lytique et leur fonction

	ORF	Nom commun	Fonction
Très précoces	BRLF1 BZLF1	Rta, R Zebra, Z, EB1	Activateur transcriptionnel et initiation du cycle lytique
Précoces	BALF1 BALF2 BALF5 BaRF1 BARF1 BBLF4 BGLF5 BGLG4 BHRF1 BILF1 BKRF3 BLLF3 BMLF1 BMRF1 BNLF2a BORF2 BSLF1 BXLf1	EB2, Mta, SM	Effet anti-BHRF1 Protéine majeure de liaison à l'ADN ADN polymérase Petite sous-unité de la Ribonucléotide réductase Protéine associée à la transformation ?/ CSF-1 Hélicase Exonucléase alcaline Protéine kinase Analogue viral du Bcl2 Récepteur transmembranaire couplé aux protéines G Uracil-ADN glycosylase Desoxyuridine triphosphatase Régulateur post-transcriptionnel Protéine accessoire de la polymérase Protéine d'ancrage / Evasion immune Grande sous-unité de la Ribonucléotide réductase Primase Thymidine kinase
Tardifs	BALF3 BALF4 BBRF1 BBRF2 BcLF1 BCRF1 BDLF1 BDLF3 BdRF1 BFRF3 BGLF2 BILF2 BKRF2 BLLF1 BXLf2	gp110/glycoprotéine B gp42 gp100-150 VCA p40 VCA p18 gp55-78 gp25/glycoprotéine L gp350/220 gp85 /glycoprotéine H	Glycoprotéine d'enveloppe Glycoprotéine d'enveloppe Protéine de capsid Glycoprotéine d'enveloppe Protéine majeure de capsid IL-10 viral Protéine mineure de capsid Glycoprotéine d'enveloppe Protéine d'échafaudage Protéine de capsid Terminase Glycoprotéine d'enveloppe Glycoprotéine d'enveloppe Glycoprotéine d'enveloppe Glycoprotéine d'enveloppe

ORF= Open Reading Frame; CSF = Colony Stimulating Factor; VCA = Viral Capsid Antigen

⇒ **Les ARN et micro-ARN viraux non codant**

On distingue les EBERs (*EBV-encoded small RNA*), les ARN BARTs (BamH1 A Rightward Transcript) et les micro-ARN mi-BART et mi-BHRF.

- **Les EBERs 1 et 2** sont de petits ARN non-polyadénylés exprimés dans toutes les formes de latence du virus. Ils représentent les transcrits viraux les plus abondants et sont généralement utilisés comme cible pour détecter la présence du virus EBV dans les cellules tumorales (Young et al., 2007). Leurs fonctions font encore l'objet d'études. Ils joueraient un rôle dans la maturation des ARN viraux et seraient impliqués dans la production d'interférons et de

cytokines par les cellules (Kitagawa et al., 2000; Samanta et al., 2008; Yang et al., 2004) avec comme conséquences un signal de prolifération cellulaire (Banerjee et al., 2013) et une résistance à l'apoptose (Yamamoto et al., 2000).

- **Les ARN BARTs** ont été décrits aussi bien dans des tissus de tumeurs associées à EBV (Chiang et al., 1996; Deacon et al., 1993; Hitt et al., 1989; Tao et al., 1998) que dans le sang périphérique de porteurs sains du virus EBV (Chen et al., 1999). Ils sont au nombre de 4 : BARF0, BARF1, A73 et RPMS1 (Karran et al., 1992; Sadler and Raab-Traub, 1995; Smith et al., 2000) et ne semblent pas nécessaire à l'immortalisation *in vitro* des lymphocytes B (Robertson et al., 1994). Les transcrits BARTs, en particulier RPMS1, seraient impliqués dans la régulation négative d'EBNA2 (Smith et al., 2000).
- **Les mi-ARN** sont de petits ARN non codant impliqués dans la régulation négative post-transcriptionnelle des ARN messagers (ARNm) (Kim and Nam, 2006). EBV code pour une cinquantaine de mi-ARN matures répartis en 2 clusters sur le génome – les régions BART et BHRF1 – et différenciellement exprimés en fonction du type de latence (Cai et al., 2006; Forte and Luftig, 2011; Pfeffer et al., 2004). Par des effets sur l'apoptose et des mécanismes d'échappement au système immunitaire, ces mi-ARN jouent un rôle essentiel dans l'immortalisation des cellules infectées et le maintien de la latence (Albanese et al., 2016; Bahri, 2018; Marquitz et al., 2015).

3.2.2. Cycle biologique

3.2.2.1. Contamination

La transmission du virus EBV se fait principalement par voie salivaire. Le jeune enfant se contamine souvent par les membres de la famille ou d'autres camarades de jeu à travers les gouttelettes de salive ou d'objets contaminés. Les adolescents et jeunes adultes sont généralement infectés par contact étroit avec la salive infectée au cours d'un baiser. Une contamination par transfusion sanguine ou après greffe d'organe est possible mais rare. La contamination par voie sexuelle est parfois évoquée mais reste controversée. La transmission materno-fœtale est rare. Le virus peut être retrouvé dans le lait maternel mais les IgG ou IgA anti-EBV transmis à l'enfant par voie transplacentaire ou maternel semblent jouer un rôle protecteur (Germi et al., 2011; Karrer and Nadal, 2014; Sawyer et al., 1971).

3.2.2.2. Cellules cibles

On distingue d'une part les cellules cibles conventionnelles et les cellules cibles non conventionnelles. Les premières sont représentées essentiellement par les lymphocytes B et les cellules épithéliales. La pénétration du virus dans les cellules B fait intervenir la glycoprotéine d'enveloppe gp350/220 qui se fixe sur les récepteurs 1 et 2 du complément (CR1 = CD35 et CR2 = CD21) et la molécule CMHII présente à la surface des cellules B sert de corécepteur et interagit avec les glycoprotéines virales gp25 et gp85 (Haan et al., 2000; Hutt-Fletcher, 2007; Nijland et al., 2016). Le virus s'attache aux intégrines $\alpha\beta$ et au récepteur de type A2 de l'éphrine sur la cellule épithéliale (Chen et al., 2018; Hutt-Fletcher, 2017; Zhang et al., 2018). Les cellules cibles non conventionnelles incluent les lymphocytes T (Coleman et al., 2018; Kikuta et al., 1988), les lymphocytes *Natural Killers* (NK) (Hart et al., 1992), les monocytes (Revoltella et al., 1989), les cellules folliculaires dendritiques (Lindhout et al., 1994) et les polynucléaires neutrophiles (Larochelle et al., 1998).

3.2.2.3. Cycle de vie dans les lymphocytes B

La primo-infection à EBV survient en général dans l'enfance (Henle and Henle, 1976; Joncas et al., 1974; Rochford, 2016) et est souvent asymptomatique à cet âge (Joncas et al., 1974; Thorley-Lawson, 2015). Lorsqu'elle survient un peu plus tardivement chez l'adolescent ou le jeune adulte, la primo-infection à EBV donne un tableau de mononucléose infectieuse (Dolcetti et al., 2013). Après la primo-infection, EBV persiste à vie dans les lymphocytes B infectés de façon latente, sans symptômes cliniques et procède occasionnellement à des épisodes de réactivation (Hjalgrim et al., 2007; Rochford, 2016; Thorley-Lawson, 2005). Cette réactivation peut entraîner la production de nouveaux virus infectieux qui peuvent soit être excrétés dans la salive, favorisant la transmission interhumaine ; soit infectés de nouveaux lymphocytes B dans l'oropharynx, augmentant ainsi le pool de cellules B infectées (Nijland et al., 2016).

Le cycle de vie du virus implique ainsi deux phases : une phase dite de latence et une autre dite cycle lytique, au cours desquelles le virus utilise différents programmes de transcription géniques, caractérisés chacun par l'expression d'une variété spécifique de protéines virales. Les étapes du cycle de vie d'EBV sont résumées dans la figure 1 de l'article 2 (Page 87).

⇒ **La phase de latence**

Après contamination par la salive, une infection lytique primaire se déroule dans les cellules épithéliales de l'oropharynx (Saha and Robertson, 2019). En même temps, se déroule l'infection des cellules B naïves aboutissant à terme à l'établissement de la latence (Nijland et al., 2016; Saha and Robertson, 2019; Thorley-Lawson, 2005; Thorley-Lawson and Gross, 2004). Cinq types de latence sont décrits :

- **La latence de type III** est le premier programme de transcription après l'infection d'une cellule B naïve. Il est appelé « programme de croissance » et est caractérisée par l'expression des 9 protéines de latence répertoriées dans le tableau II associées aux ARN non codants EBER et BART. L'expression des protéines de latence est sous le contrôle des promoteurs Cp et Wp. Ces protéines vont activer et faire proliférer les lymphocytes B infectés qui se différencient en lymphoblastes et forment un centre germinatif (CG) dans le tissu lymphoïde de l'oropharynx (amygdales+++). Chez le sujet immunocompétent, cette phase déclenche une puissante réaction immunitaire cytotoxique T pour éliminer les cellules infectées. Cette forme de latence est donc retrouvée *in vivo* en l'absence de cette réponse immunitaire comme dans le cas des Syndromes Lymphoprolifératifs post-transplantation (SLPT ou PTLD en anglais). C'est aussi la forme qui est généralement retrouvée dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) *in vitro* (Nijland et al., 2016; Thorley-Lawson, 2015).
- **La latence de type II** ou « programme par défaut ». La réaction immunitaire déclenchée durant la latence III n'est pas suffisante pour éliminer tous les lymphocytes B infectés (Nijland et al., 2016). Les cellules B qui auront échappé au système immunitaire vont par la suite éteindre l'expression de toutes les protéines de latence sauf EBNA1 et les LMP1 et 2 sous le contrôle du promoteur Qp. Les ARN EBERs et BART sont également exprimés durant cette phase. Dans les CG, les blastes proliférant se différencient en centroblastes puis centrocytes (Babcock et al., 2000). Cette forme de latence est retrouvée par exemple dans les Carcinomes du nasopharynx, le Lymphome de Hodgkin ou encore les Lymphomes T/NK.
- **Latence de type 0**. Les centrocytes se différencient ensuite en lymphocytes B mémoires quiescents qui n'expriment aucune protéine de latence, échappant ainsi à tout contrôle

immunitaire. Seuls les ARNs EBER et BART sont présents durant cette phase (Babcock et al., 1998).

- **Latence de type I.** Périodiquement, la protéine faiblement immunogène EBNA1 est exprimée, sous le contrôle du promoteur Qp. Les ARN EBER et BART restent présents. Ce profil est retrouvé durant la division cellulaire des cellules B mémoires infectées. EBNA1 permet de relier le génome viral aux chromosomes de la cellule hôte afin d'en assurer la réplication et la ségrégation dans chaque cellule fille (Hochberg et al., 2004). En pathologie, la latence de type I est essentiellement associée au LB.
- **Latence atypique.** Elle est caractérisée par l'expression des protéines EBNA1 et 3 ainsi que d'une forme tronquée de la protéine EBNA-LP sous le contrôle du promoteur Wp (Hutchings et al., 2006). Ce profil a été décrit dans des cas de LB, ainsi que dans la lignée cellulaire P3HR1. Dans la souche virale correspondante, on note une délétion du gène EBNA2 et une perte du pouvoir transformant *in vitro* (Kelly et al., 2002, 2005).

⇒ **Le cycle lytique**

In vivo, occasionnellement, en réponse à divers stimuli, les cellules B mémoires infectées peuvent être recrutées dans des réactions du CG à l'issue desquelles elles peuvent activer le cycle lytique du virus. *In vitro*, le virus peut être réactivé dans les LCLs par l'utilisation de divers substances chimiques telles que les esters de Phorbol (TPA = 12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate) ou les inhibiteurs des histones désacétylases (iHDAC) (sodium butyrate, Trichostatine A, Abexinostat...) (Davies et al., 1991; Hui et al., 2012; Murata and Tsurumi, 2014) ou par surexpression de la protéine Zebra. D'autres facteurs tels que le stress oxydatif, l'hypoxie, la stimulation du BCR, le TGF- β peuvent également activer le virus *in vitro* (Kenney and Mertz, 2014).

La première protéine du cycle lytique à être produite est la protéine très précoce Zta ou Zebra, qui déclenche le switch phase de latence-cycle lytique (Countryman and Miller, 1985; Grogan et al., 1987). Zebra est un facteur de transcription nucléaire (voir pages 90 à 94 pour plus de détails sur la protéine Zebra, sa structure et ses mécanismes d'action) qui va directement activer la transcription du 2ème gène très précoce *BRLF1*, codant pour un autre facteur de transcription Rta. Zebra et Rta vont ensuite agir en synergie pour activer l'expression des gènes précoces impliqués dans la réplication de l'ADN viral et des gènes tardifs responsables de la production des protéines structurales (Tsurumi et al., 2005). Selon l'expression plus ou moins complète des

gènes lytiques, on distingue deux types de cycle lytique : productif et abortif (Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018; Münz, 2019).

- o ***L'infection lytique productive*** est caractérisée par une expression séquentielle des protéines du cycle lytique et aboutit à la production de nouvelles particules virales infectieuses et à la lyse de la cellule infectée. Cette forme d'infection est donc caractérisée par une expression complète des gènes très précoces, précoces et tardifs du cycle lytique. La transcription des gènes tardifs qui permet la production de nouveaux virus infectieux dépend d'un complexe viral d'initiation de la transcription qui inclut la protéine BcRF1 et la protéine virale TBP-like (Aubry et al., 2014). Une autre protéine virale indispensable à la production de nouvelles particules infectieuses est le facteur d'exportation d'ARNm EB2 codé par le gène *BMLF1* (Gruffat et al., 2002). *In vivo*, l'infection lytique productive est déclenchée uniquement par la différenciation terminale des lymphocytes B mémoire en plasmocytes (Laichalk and Thorley-Lawson, 2005) via les facteurs de transcription associés aux plasmocytes BLIMP1 et XBP1 (McDonald et al., 2010; Reusch et al., 2015). Chez les porteurs sains, seule une minorité de lymphocytes B mémoire aboutissent à une infection lytique productive après stimulation (Al Tabaa et al., 2009).
- o ***L'infection lytique abortive*** est caractérisée par une expression des protéines très précoces et précoces sans expression des gènes lytiques tardifs. Il n'y a donc pas production de nouvelles particules virales infectieuses, ni de lyse de la cellule infectée. Cette infection lytique abortive peut-être observée immédiatement après l'infection primaire d'une cellule B naïve avant l'établissement de la latence et est alors appelée « infection lytique abortive transitoire pré-latence » (Chiu and Sugden, 2016; Erising et al., 2017; Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018; Wen et al., 2007). L'expression durant cette phase de pré-latence de certains gènes lytiques comme *BZLF1*, *BRLF1*, *BHRF1*, *BCRF1* *BALF1* participe à l'immortalisation des cellules infectées en leur conférant une résistance à l'apoptose et une capacité d'échappement au système immunitaire (Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018; Münz, 2019). L'infection lytique abortive joue un rôle important dans l'oncogénicité du virus EBV et sera beaucoup abordé dans notre travail. Cependant, le processus du cycle lytique abortif *in vivo* demeure encore peu maîtrisé. Ces questions ont été adressées dans la conclusion de l'article 2 (Page 98).

3.3. Épidémiologie

EBV est le virus le plus répandu chez l'homme, présent dans toutes les régions géographiques et infectant plus de 90% de la population mondiale (Cohen, 2000; Germi et al., 2011; Tsurumi et al., 2005).

L'âge moyen de survenue de la primo-infection varie d'une région géographique à l'autre. En effet, dans les pays en développement, la primo-infection est très précoce et dès la 3^{ème} année de vie, presque tous les enfants ont déjà été en contact avec le virus. Dans les pays développés, la primo-infection survient en général à l'adolescence ou chez l'adulte jeune (Germi et al., 2011; Henle and Henle, 1976; Joncas et al., 1974). En revanche, il n'est pas rapporté une différence de séroprévalence selon le sexe.

On note par ailleurs une variabilité des souches circulants d'EBV d'un pays à un autre. Le type 1 est retrouvé partout dans le monde avec une fréquence plus élevée dans la population caucasienne et asiatique alors que le type 2 est essentiellement retrouvé en Afrique avec une prévalence au moins équivalente à celle du type 1 dans certaines régions d'Afrique. Des cas de co-infection type 1 et 2 ont également été décrits et seraient plus fréquents chez les personnes immunodéprimés (Farrell, 2015; Germi et al., 2011; Kunimoto et al., 1992; Neves et al., 2017; Young et al., 1987). Le tableau IV répertorie la prévalence des souches 1 et 2 dans des cohortes de différents pays. Comme constaté dans ce tableau, les données en Afrique restent rares, particulièrement en Afrique de l'ouest.

Tableau IV: Fréquence des différentes souches d'EBV selon les pays

	Pays	Population d'étude	Taille de l'échantillon	EBV Type 1 (%)	EBV Type 2 (%)	EBV Type1+2 (%)	Références
ASIE	Chine	CNPI	37	86	14	0	(Hu et al., 1991)
	Corée	Sujets sains	31	81	15	4	(Kim et al., 2002)
		LNHB	24	95	5	0	
		LNHT	15	93	7	0	
		LH	17	73	9	18	
	Japon	Sujets sains	21	95	5	0	(Kunimoto et al., 1992)
		Amygdalites	37	92	8	0	
	Taiwan	CNPI	53	94	4	2	(Shu et al., 1992)
		Sujets sains	26	85	3	12	
		Autres cancers tête et cou	27	78	7	15	
AMERIQUE	Alaska	CNPI	3	0	100	0	(Abdel-Hamid et al., 1992)
	E.U.A.	SLPT	24	100	0	0	(Frank et al., 1995)
	Mexique	LH	34	32	56	12	(Palma et al., 2013)
	Argentine	Sujets sains	193	78	15	7	(Correa et al., 2004)
	Brésil	LB	21	86	14	0	(Klumb et al., 2004)
EUROPE	Danemark	LH	55	93	5	1	(Sandvej et al., 1994)
OCEANIE	Australie	VIH+	56	24	27	39	(Kyaw et al., 1992)
		Transplantés	18	39	33	28	
		Mixte	55	98	2	0	
	Nouvelle Guinée	LB	43	47	51	2	(Aitken et al., 1994)
AFRIQUE	Afrique centrale	LB	16	50	50	0	(Goldschmidts et al., 1992)
	Afrique équatorial	LB	10	80	20	0	(Abdel-Hamid et al., 1992)
	Afrique du Sud	CNP	15	93	0	7	(Janse van Rensburg et al., 2000)
	Tunisie	CNP	31	100	0	0	(Ayadi et al., 2007)

CNPI= Carcinome nasopharyngé indifférencié ; LNHB = Lymphome Non Hodgkinien B ; LNHT = Lymphome Non Hodgkinien T ; LH = Lymphome de Hodgkin ; SLPT = Syndrome Lymphoprolifératif Post Transplantation ; LB = Lymphome de Burkitt ; CNP = Carcinome nasopharyngé

3.4. Pathologies associées

Malgré sa persistance asymptomatique chez la majorité des sujets infectés, EBV est associé chez une faible proportion de la population à une panoplie de pathologies aussi bien bénignes que malignes.

⇒ **Les pathologies bénignes associées au virus EBV** (Tableau V) sont essentiellement représentées par :

- o La mononucléose infectieuse qui constitue la forme symptomatique de la primo-infection lorsqu'elle survient tardivement chez l'adolescent ou l'adulte jeune
- o Les Lymphoproliférations T/NK associées à EBV pouvant être aiguës transitoires ou chroniques et progressives. Le virus est surtout retrouvé dans les lymphocytes T/NK avec possibilité d'expansion clonale et d'évolution vers un lymphome (Sawada et al., 2017; Voirin, 2017).
- o La leucoplasie orale chevelue qui est une hyperplasie épithéliale de la muqueuse buccale généralement retrouvée chez les sujets immunodéprimés.
- o Le syndrome de Purtilo ou Syndrome Lymphoprolifératif lié à l'X qui est une maladie héréditaire qui entraîne une déficience en cellules T et par conséquent une réponse immunitaire cellulaire à l'infection par EBV inadaptée. Il peut évoluer vers un lymphome (Nichols et al., 2005).
- o Les maladies auto-immunes telles que le Lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérodermie généralisée ou encore la polyarthrite rhumatoïde (Cohen, 2000; Karrer and Nadal, 2014; Kutok and Wang, 2006)

Tableau V: Pathologies bénignes associées au virus EBV

Pathologies bénignes associées au virus EBV	
-	Mononucléose infectieuse
-	Lymphoproliférations T/NK
o	Aigue / Transitoire
•	Lymphohistiocytose Hémophagocytaire
•	Hydroa vacciniforme classique
o	CAEBV
•	Forme systémique
•	Formes cutanées
▪	Hypersensibilité à la pique de moustique
▪	Hydroa vacciniforme sévère
-	Maladies auto-immunes (LED, Sclérodermie, PR)
-	Leucoplasie orale chevelue
-	Syndrome de Purtilo

⇒ ***Les pathologies malignes associées au virus.***

La grande majorité des pathologies associées au virus EBV est représentée par les cancers. Ces cancers EBV-induits représentent environ 1,5% des cancers dans le monde (Farrell, 2019) et sont retrouvés aussi bien chez les sujets immunocompétents que chez ceux présentant un déficit immunitaire congénital ou acquis. Il s'agit essentiellement de lymphoproliférations B ; mais les néoplasies associées au virus EBV peuvent également se développer aux dépens des cellules épithéliales, T, NK ou plus rarement d'autres tissus (Voir pages 89 et 90, Tableaux 1 et 2 de l'article 2). Seul le Lymphome de Burkitt qui fait l'objet de notre travail sera abordé dans le 5^{ème} chapitre de cette partie.

3.5. Oncogenèse liée au virus EBV

L'oncogenèse peut être considérée comme l'ensemble des mécanismes conduisant à la transformation cellulaire et qui aident les cellules nouvellement transformées à acquérir les capacités caractéristiques des cellules tumorales (Figure 15). Ces caractéristiques comprennent : une prolifération incontrôlée ; un échappement aux contrôles par les gènes suppresseurs de tumeurs ; une évasion à la réponse immunitaire ; une résistance à l'apoptose ; une immortalité répllicative ; une capacité d'induction de l'angiogenèse ; une dérégulation de l'énergie cellulaire et une activation de l'invasion tumorale et des métastases. Il est également admis que l'acquisition de ces caractéristiques par les cellules tumorales est en grande partie rendue possible par deux facteurs favorisant : l'inflammation tumorale et l'instabilité du génome (Hanahan and Weinberg, 2011).

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent l'oncogenèse EBV-induite restent encore en partie méconnus. Presque tous les néoplasies associés au virus EBV sont associées à un type de latence virale particulier (Pages 89-90, Tableaux 1 et 2 de l'article 2) si bien que pendant longtemps, les propriétés oncogéniques du virus EBV ont surtout été attribuées aux protéines de latence. En effet, le cycle lytique, normalement supposé aboutir à la lyse de la cellule infectée était uniquement associé à une augmentation du pool des cellules infectées et un maintien de la transmission virale interhumaine. Cependant, il existe de plus en plus de preuves de l'implication directe des protéines du cycle lytique dans les processus de transformation cellulaire. Nous verrons dans les paragraphes suivants comment les protéines de latence et/ou

du cycle lytique d'EBV contribuent à l'acquisition par les cellules des caractéristiques tumorales décrites dans la figure 15.

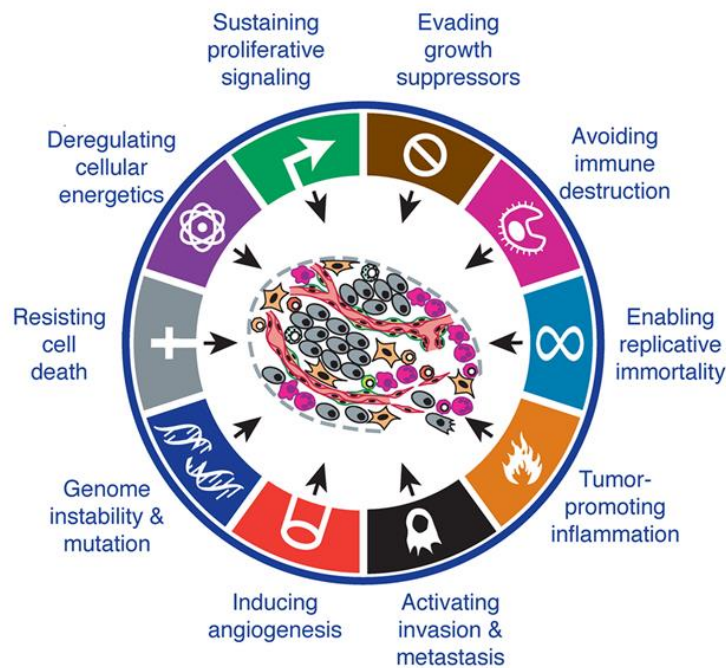


Figure 15: Les dix caractéristiques des cellules tumorales
Selon (Hanahan and Weinberg, 2011).

3.5.1. Effets oncogènes des protéines de latence et des transcrits non-codant

Les propriétés oncogéniques des différentes protéines et transcrits non-codant exprimés pendant les différents types de latences sont résumés dans la figure 16.

⇒ **La protéine EBNA1** est la seule protéine retrouvée dans toutes les formes de latence et par conséquent dans presque toutes les néoplasies associées à EBV. Elle joue un rôle essentiel dans le maintien de la forme épisomale du virus et sa réplication au cours de chaque cycle cellulaire, probablement via une interaction avec RCC1 (*Regulator of Chromosome Condensation 1*) (Deschamps et al., 2017). EBNA1 ne semble pas être indispensable pour la transformation des cellules B *in vitro* mais pourrait contribuer à l'oncogenèse. En effet, EBNA 1 interfère avec l'axe p53/Mdm2 via une interaction avec USP7 (*Ubiquitin-specific protease 7*) avec comme conséquence un effet anti-apoptotique par diminution de p53 et augmentation de la survivine (Frappier, 2012; Kennedy et al., 2003; Lu et al., 2011). Un autre

effet anti-apoptotique a également été rapporté par inhibition de l'expression de la protéine pro-apoptotique Bim dans des cellules de LB (Wang et al., 2019). Une implication d'EBNA1 dans le développement des cancers gastriques associés à EBV par induction d'une perte des corps nucléaires PML a également été rapportée ; cette perte étant associée à une augmentation de la survie cellulaire par diminution de p53 et diminution de l'apoptose en réponse à des dommages d'ADN (Sivachandran et al., 2012). EBNA1 pourrait également réguler positivement la prolifération cellulaire par une induction PI3K-dépendant de l'expression de l'oncogène *c-MYC* (Gnanasundram et al., 2017; Wilson et al., 2018). Grâce à sa région Gly/Ala (constituée par une répétition de résidus de Glycine et d'Alanine), EBNA1 résiste à la dégradation par le protéasome et empêche sa présentation aux lymphocytes T cytotoxique par les molécules du CMHI (Dantuma et al., 2000; Levitskaya et al., 1997; Zhang and Coffino, 2004). Cet effet permet à la cellule d'échapper au système immunitaire. De plus, EBNA1 est associée à une perturbation de la régulation des télomères au niveau des chromosomes (Kamranvar and Masucci, 2011; Kamranvar et al., 2013) et une production de ROS, sources de dommages d'ADN et d'instabilité génomique (Cao et al., 2012; Gruhne et al., 2009). Dans des lignées cellulaires de CNP, EBNA1 a été associée à une surexpression de trois protéines impliquées dans le potentiel métastatique stathmine 1, maspine, et Nm23-H1 (Cao et al., 2012).

⇒ **Les protéines EBNA2 et EBNA1** sont les premières protéines de latence à être exprimées après la primo-infection d'une cellule B naïve. EBNA1 joue essentiellement un rôle de cofacteur d'EBNA2. Elles sont indispensables à l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* comme en témoigne la perte du pouvoir transformant de la souche virale produite par la lignée P3HR1 en raison d'une délétion du gène *EBNA2* et des 2/3 de la séquence codante du gène *EBNA1* (Cohen et al., 1989; Hammerschmidt and Sugden, 1989; Kelly et al., 2005; Rabson et al., 1982). EBNA2 représente facteur de transcription viral qui active, via l'interaction avec les facteurs de transcription cellulaire RBP-Jk et EBF1, la voie de signalisation Notch impliquée dans la prolifération cellulaire et l'apoptose entre autres. EBNA2 est également capable d'activer la transcription de nombreux gènes cellulaires y compris l'oncogène *c-MYC* (Kaiser et al., 1999; Zhao et al., 2006). Une survie des cellules lymphomateuses en présence de Doxorubicine a été décrit en rapport avec une surexpression des chimiokines CCL3 (*Chemokine Ligand 3*) et CCL4 (*Chemokine Ligand 4*)

induite par EBNA 2 (Kim et al., 2017). Un effet anti-apoptotique d'EBNA2 par inhibition de l'interaction de la protéine Nur77 avec la mitochondrie au cours de l'apoptose a également été rapporté (Lee et al., 2002). L'activité anti-apoptotique d'EBNA2 pourrait également passer via une diminution de l'expression du gène pro-apoptotique *BIK* ce qui s'oppose à l'apoptose induite par TGF- β (Campion et al., 2014) ou une transactivation du gène anti-apoptotique *BFL-1* (Pegman et al., 2006). EBNA1P, participe également à cet effet anti-apoptotique via une neutralisation de la protéine p14^{ARF} et une interaction avec Mdm2, favorisant ainsi la dégradation de p53 (Kashuba et al., 2003, 2011).

⇒ **La famille des protéines EBNA3** est constituée par les protéines EBNA3A, EBNA3B et EBNA3C qui agissent comme des facteurs de transcription, régulant l'expression de gènes viraux et cellulaires. EBNA3B n'est pas nécessaire pour la transformation des cellules B (Chen et al., 2005) et agirait plus comme un suppresseur de tumeur, sa délétion étant associée au développement de lymphomes dans des modèles de souris humanisés (White et al., 2012). Contrairement à EBNA3B, les EBNA3A et 3C semblent indispensables à l'immortalisation et à la transformation des cellules B (Tomkinson et al., 1993) et sont considérées comme des oncoprotéines virales (Saha and Robertson, 2019). Elles coopèrent et diminuent l'expression des suppresseurs de tumeurs *p16INK4a* et *p14ARF* (Maruo et al., 2011). EBNA3A et 3C induisent aussi une résistance à l'apoptose par répression de l'expression la protéine pro-apoptotique Bim (Anderton et al., 2008) ou encore par stabilisation de Mdm2 favorisant la dégradation de p53 (Saha et al., 2009). EBNA3A favoriserait également la prolifération des cellules infectées par inhibition de l'effet antiprolifératif de la protéine MIZ-1 (*Myc-interacting Zinc finger protein-1*) (Bazot et al., 2014). EBNA3C est également susceptible d'induire des dommages d'ADN par l'induction d'une expression de l'enzyme AID (Kalchschmidt et al., 2016) impliquée dans la formation de translocations chromosomiques au cours de certains lymphomes (Dorsett et al., 2007; Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008).

⇒ **Les protéines LMP** sont représentées par LMP1, LMP2A et LMP2B.

LMP1 est un des principaux oncoprotéines du virus EBV et est essentielle à la transformation des cellules B infectées mais également des cellules non lymphoïdes (El-Sharkawy et al., 2018; Kaye et al., 1996). LMP1 favorise le recrutement du DNMT1 (DNA methyltransferase 1) sur le gène KDM2B (Lysine (K) demethylase 2B), induisant son hyperméthylation et par

conséquent une diminution de son expression, ce qui faciliterait ainsi la transcription du génome viral (Vargas-Ayala et al., 2019). LMP1 active diverses voies de signalisation (PI3K/AKT ; p38 MAPK ; NF-KB ; JAK/STAT ; JNK, ERK,...) impliquées dans les processus cellulaires tels que l'apoptose, la prolifération et les métastases (El-Sharkawy et al., 2018). LMP1 est considéré comme un récepteur constitutivement actif mimant le récepteur CD40 des lymphocytes B entraînant ainsi une activation et une prolifération des cellules infectées. Elle interfère avec la réponse immunitaire de l'hôte et favorise un environnement inflammatoire par induction de la synthèse de chimiokines telles que CCL3, CCL4, CCL5, CCL17 et CCL22. Ces deux derniers contribueraient à l'évasion immunitaire des cellules infectées (Nakayama et al., 2004). Une régulation négative des récepteurs TLR9 (*Toll-Like receptor 9*) via l'activation de la voie NF-KB par LMP1 a également été impliquée dans les mécanismes d'échappement immunitaire (Fathallah et al., 2010). En plus, LMP1 peut exercer un effet anti-apoptotique par induction de l'expression des gènes anti-apoptotiques *Bcl2*, *Mcl-1* et *A20* (Fries et al., 1996; Zeng et al., 2020) ; par induction d'une accumulation de l'oncoprotéine $\Delta Np73\alpha$, un puissant antagoniste de p53 (Accardi et al., 2013) ; ou encore en bloquant la voie de signalisation p16INK4a/RB (Ohtani et al., 2003). LMP1 est associée à une répression du gène suppresseur de tumeur *DOK1* via un mécanisme épigénétique (Siouda et al., 2014). Elle augmente également une instabilité génomique en activant le promoteur du gène *AICDA* via un mécanisme dépendant du facteur de transcription Egr-1 (Kim et al., 2013a). Par l'intermédiaire de l'induction de facteurs angiogéniques (HIF- α , VEGF, FGF2...), l'inhibition des suppresseurs de métastase tels que RECK1 et E-cadhérine ou la régulation des métalloprotéases MMP9 et MMP1, LMP1 contribue au potentiel métastatique des tumeurs associées à EBV (Chew et al., 2010; Murono et al., 2001; Stevenson et al., 2005; Wakisaka et al., 2004).

LMP2A mime le récepteur des cellules B (BCR) leur donnant ainsi un signal de survie (Mancao and Hammerschmidt, 2007). Son inhibition est associée à une diminution de la prolifération cellulaire dans des cellules de carcinome gastrique (Wang et al., 2017). LMP2A active la voie de signalisation Ras/PI3K/AKT avec inhibition de l'apoptose induite par le BCR (Fukuda and Longnecker, 2005) et une augmentation de Bcl-X_L qui neutralise les protéines pro-apoptotiques Bim et Puma (Portis and Longnecker, 2004). De plus, l'activation de la voie ERK/MAPK par LMP2A aboutit à la phosphorylation de Bim qui est secondairement

ubiquitinée et dégradée par le protéasome (Portis and Longnecker, 2004). LMP2A stimule aussi la production d'interleukine (IL)-10 impliquée dans la survie cellulaire et dans la réponse immunitaire antitumorale (Incrocci et al., 2013, 2017). La signalisation induite par LMP2A est aussi associée à une diminution de l'expression des molécules du CMH II dans les cellules B, contribuant aux mécanismes d'échappement immunitaires (Lin et al., 2015). LMP2A contribuerait également au maintien d'un microenvironnement tumoral pro-inflammatoire favorable à la prolifération et à la survie des cellules par induction de production de MIP1- α (*Macrophage Inflammatory protein 1-alpha*) encore appelé CCL3 (Incrocci et al., 2019).

Les effets oncogéniques de la protéine LMP2B, une isoforme tronquée de LMP2A sont moins bien connus. Elle serait plus un régulateur négatif de LMP2A.

⇒ ***Les transcrits non codant***

Les EBERs sont les transcrits les plus abondants et sont présents dans toutes les phases du cycle viral. Plusieurs données leur suggèrent un rôle important dans l'oncogenèse induite par EBV. Les EBERs favorisent la prolifération des cellules infectées par induction d'une production de cytokines qui agissent comme des facteurs de croissance autocrines : IL-10 dans les cellules B (Kitagawa et al., 2000; Samanta et al., 2008) ; IL-9 dans les cellules T (Yang et al., 2004) et IGF1 (*Insulin-like Growth factor*) dans les cellules épithéliales (Iwakiri et al., 2003). Une diminution de l'expression des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27 contribue également à promouvoir la prolifération cellulaire dans les cancers gastriques, associée à une résistance à la chimiothérapie et une invasion tumorale (Banerjee et al., 2013). Les EBERs possèdent également des propriétés anti-apoptotique par induction de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Komano et al., 1999) et inhibition de l'apoptose induite par les IFN (Nanbo et al., 2002; Yamamoto et al., 2000).

Les transcrits BART et les miARN d'EBV peuvent également contribuer à l'acquisition d'un phénotype tumoral par les cellules infectées. Ils seraient en effet impliqués dans la survie, la prolifération et la transformation des cellules infectées (Feederle et al., 2011b, 2011a; Forte and Luftig, 2011; Kuzembayeva et al., 2014; Pfeffer et al., 2004).

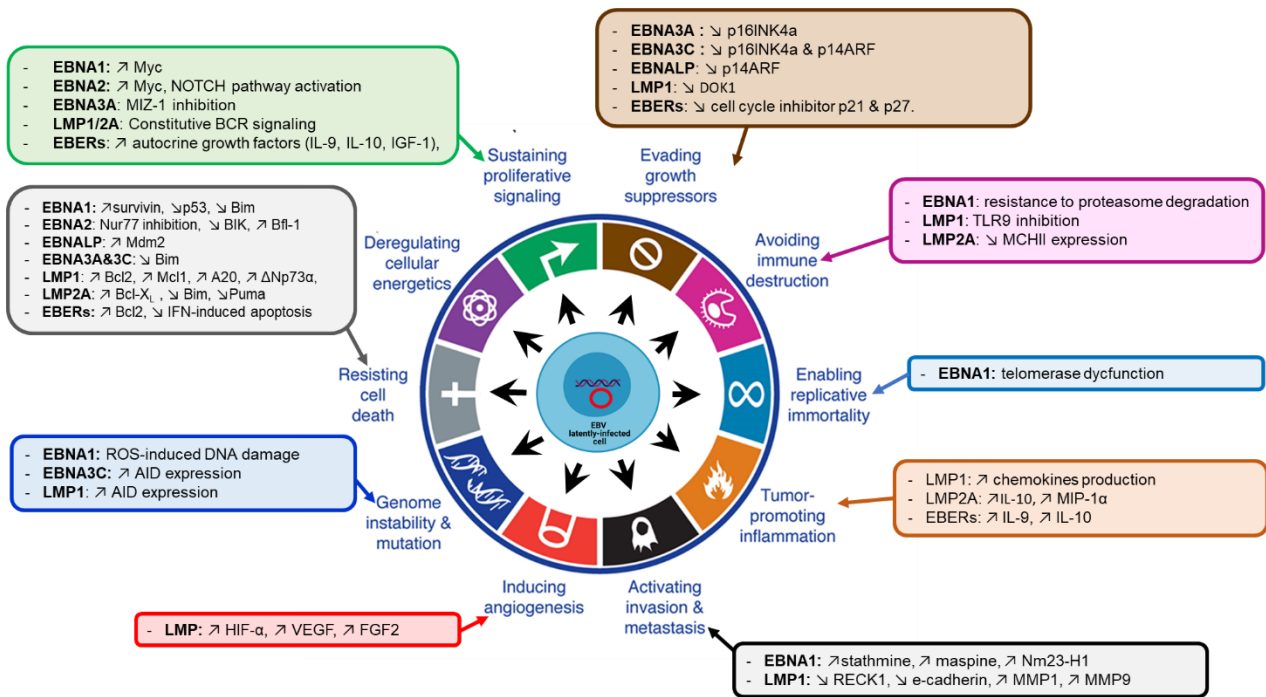


Figure 16: Potentiels effets oncogéniques des protéines de latence du virus EBV
(Modifié et Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011)).

3.5.2. Effets oncogènes des protéines du cycle lytique

Les effets oncogéniques du cycle lytique par l'intermédiaire du transactivateur Zebra ou de ses gènes cibles ont été largement discutés dans l'article 2 présentée à la partie 3.6. Le cycle lytique productif est surtout associé à une augmentation du pool des cellules infectées. Les produits du cycle lytique abortif, en particulier la protéine Zebra sont impliqués dans la prolifération cellulaire, la résistance à l'apoptose, l'évasion immunitaire, l'immortalité cellulaire, la néoangiogenèse et les métastases ; le tout dans un contexte inflammatoire et d'instabilité génomique (Page 95, Figure 4 de l'article 2).

3.6. Article 2: Oncogenic properties of the EBV Zebra protein

Cette revue porte sur les propriétés oncogéniques de la protéine Zebra (et donc du cycle lytique d'EBV), directement ou par l'intermédiaire de ses cibles en aval. Dans le 1^{er} chapitre, nous avons introduit le virus EBV, son cycle de vie avec ses phases de latence et de réactivation, et les néoplasies associées à EBV. Le deuxième chapitre a été consacré à la structure et aux fonctions de la protéine Zebra. Dans le chapitre 3 nous avons largement discuté les propriétés oncogéniques de Zebra en axant nos propos sur son rôle dans l'acquisition des dix caractéristiques des cellules tumorales de la figure 15 proposées par Hanahan et Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2011). Nous avons ensuite abordé dans le dernier chapitre les applications diagnostiques et thérapeutiques qui peuvent découler de ses propriétés décrites de Zebra ; avant de conclure et d'adresser quelques questions qui restent encore floues. Je suis co-deuxième auteur de l'article et ma contribution a été la rédaction du 1^{er} chapitre, d'une partie du chapitre 3 et la conception des figures 1 et 4 ainsi que des tableaux 1 et 2.

Review

Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein

Diego Germini ¹, Fatimata Bintou Sall ^{1,2,†}, Anna Shmakova ^{1,†}, Joëlle Wiels ¹,
Svetlana Dokudovskaya ¹, Emmanuel Drouet ³ and Yegor Vassetzky ^{1,4,*}

¹ CNRS UMR9018, Université Paris-Saclay, Institut Gustave Roussy, 94805 Villejuif, France; germinidiego@gmail.com (D.G.); fabisall3007@gmail.com (F.B.S.); anyashm@gmail.com (A.S.); wiels@igr.fr (J.W.); svetlana.dokudovskaya@gustaveroussy.fr (S.D.)

² Laboratory of Hematology, Aristide Le Dantec Hospital, Cheikh Anta Diop University, Dakar 12900, Senegal

³ CIBB-IBS UMR 5075 Université Grenoble Alpes, 38044 Grenoble, France; Emmanuel.Drouet@ibs.fr

⁴ Koltzov Institute of Developmental Biology, 117334 Moscow, Russia

* Correspondence: yegor.vassetzky@cnrs.fr

† These authors contributed equally to this work as co-second authors.

Received: 19 May 2020; Accepted: 4 June 2020; Published: 5 June 2020



Abstract: Epstein Barr Virus (EBV) is one of the most common human herpesviruses. After primary infection, it can persist in the host throughout their lifetime in a latent form, from which it can reactivate following specific stimuli. EBV reactivation is triggered by transcriptional transactivator proteins ZEBRA (also known as Z, EB-1, Zta or BZLF1) and RTA (also known as BRLF1). Here we discuss the structural and functional features of ZEBRA, its role in oncogenesis and its possible implication as a prognostic or diagnostic marker. Modulation of host gene expression by ZEBRA can deregulate the immune surveillance, allow the immune escape, and favor tumor progression. It also interacts with host proteins, thereby modifying their functions. ZEBRA is released into the bloodstream by infected cells and can potentially penetrate any cell through its cell-penetrating domain; therefore, it can also change the fate of non-infected cells. The features of ZEBRA described in this review outline its importance in EBV-related malignancies.

Keywords: EBV; ZEBRA; Zta; BZLF1; lytic cycle; viral-host interaction; oncogenesis; transcription; transactivation

1. Introduction

Epstein-Barr Virus (EBV) or Human Herpesvirus 4, is a γ -herpesvirus that predominantly infects B-lymphocytes, and, to a lesser extent, epithelial, T and Natural Killers (NK) cells [1,2]. Discovered in 1964 as the first human oncogenic virus, EBV is one of the most widespread human viruses, affecting nearly 90% of the world's population [3,4]. After an initial infection, it persists as an episome in B cells for the rest of the host's life. In the vast majority of cases, EBV infection is asymptomatic, but in some individuals, it causes infectious mononucleosis. Furthermore, EBV is associated with various types of malignancies, including Burkitt lymphoma (BL), Hodgkin lymphomas (HL), nasopharyngeal and gastric carcinoma, and post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). Indeed, EBV was classified as a class I carcinogen by World Health Organization (WHO) [5] and the evidence for EBV-associated oncogenesis have been recently reviewed and updated [6]. The pathogenic and oncogenic effects of EBV are mediated by several EBV proteins and non-coding RNAs. Here we will describe the role of one of EBV immediate early (IE) proteins, ZEBRA, in the viral life cycle and in regulation of the host genome and the consequences thereof.

1.1. EBV Life Cycle

EBV life cycle involves a latency phase and a lytic cycle, each associated with specific gene transcription and translation programs. These phases are summarized in Figure 1.

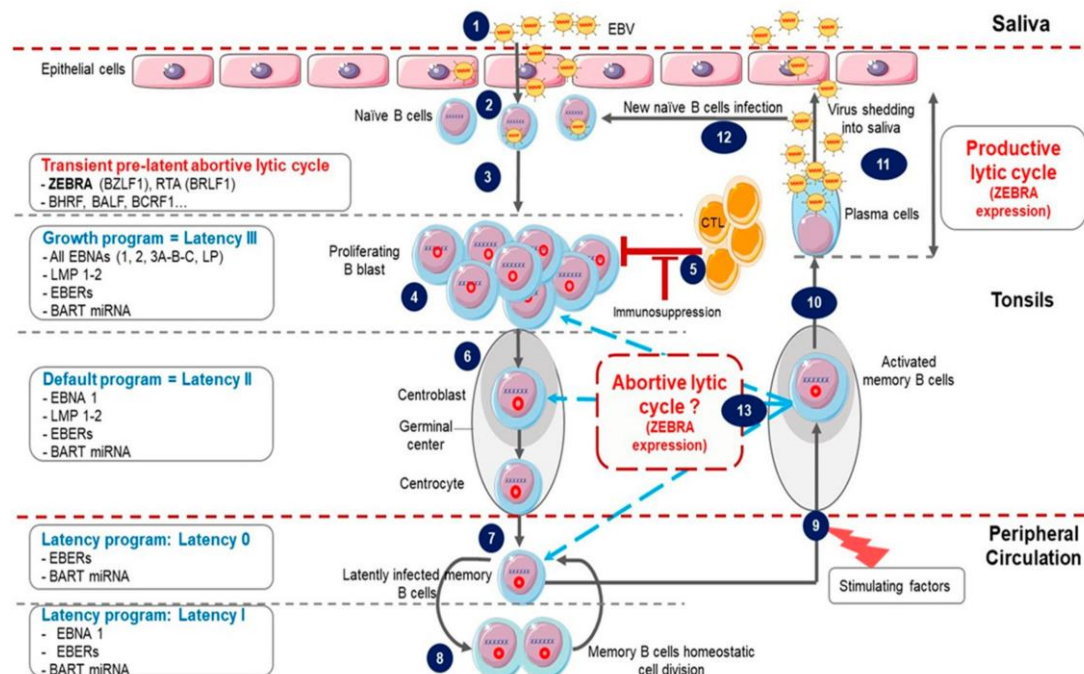


Figure 1. Epstein-Barr Virus (EBV) life cycle. (1) Infection occurs after the contact with an infected saliva. (2) After initial infection of oropharyngeal epithelial cells, the virus passes into the underlying lymphoid tissue where it infects naive B cells. (3) This immediately triggers the transient pre-latent lytic cycle with expression of ZEBRA and other lytic genes involved in resistance to apoptosis and evasion from the immune system. (4) Infected naive B cells become proliferating B blasts through the growth program (latency III) where all latency proteins are expressed. (5) Cytotoxic T lymphocytes (CTL) trigger a strong immune response (which is impaired during immunodeficiency) to eliminate EBV-infected B cells. (6) Proliferating B blasts migrate into the germinal center (GC) and activate the default transcription program (latency II) where latency protein expression is restricted to EBNA1, LMP1 and LMP2. They differentiate into centroblasts and then centrocytes. (7) Centrocytes leave the GC and differentiate into memory B cells circulating in peripheral blood. These cells have turned off the expression of all viral proteins (latency 0). (8) Occasionally, circulating EBV-positive memory B cells express EBNA1 during homeostatic cell division to ensure viral genome replication and segregation into daughter cells. (9) Following stimulation, latently infected memory B cells can be recruited into GC. (10) Activated EBV-positive memory B cells can differentiate into plasma cells, reactivate the virus and undergo productive lytic cycle that leads to (11) viral shedding into saliva and (12) new naive B cells infection. (13) Activated EBV-positive memory B cells reintegrate the pool of memory B cells. It is not clear whether in vivo stimulated EBV-positive memory B cells which have not differentiated into plasma cells undergo an abortive lytic cycle (ZEBRA and early gene expression without viral production) before reintegrating the pool of memory cells. It is also not clear whether these cells successively re-express different latency programs in the GC in vivo before reintegrating the pool of memory cells.

1.1.1. Latency

Following contamination via saliva, primary lytic infection occurs in the epithelial cells of the oropharynx [7] through virus binding to $\alpha\beta$ integrins and the ephrin A2 receptor [8,9]. EBV also infects naïve B cells by interaction with complement receptors 1 and 2 (CR1/CD35 and CR2/CD21)

as well as major histocompatibility complex (MHC) class II as a co-receptor [10,11]; this leads to latency establishment and lifelong EBV persistence. Latency can be divided into three successive programs [7,12,13].

The first, called the “growth program” or latency III is characterized by the expression of nine latency proteins (six nuclear proteins: Epstein Barr Nuclear Antigen (EBNA) 1, 2, 3A, 3B, 3C and LP, and three membrane proteins: Latent Membran Protein (LMP) 1, 2A and 2B); two Epstein Barr virus-encoded small non-coding RNAs (EBER1 and 2), BHRF1 miRNA and BamHI-A fragment rightward transcript (BART) transcripts [14,15]. EBV-infected B cells are activated and differentiate into proliferating B blasts. This phase triggers a powerful immune T cell cytotoxic response; however, it is usually insufficient to eliminate all infected B cells [12].

Remaining B blasts migrate to the tonsil germinal center (GC) where the second program, called the “default program” or latency II, occurs. Infected cells turn off the expression of all latency proteins except EBNA1 and LMP1 and 2. These proteins are thought to promote B blasts differentiation into centroblasts and then centrocytes [16].

The last program is named the “latency program” or latency 0. Centrocytes differentiate into resting memory B cells which leave the GC and circulate in peripheral blood without any latency protein expression [17]. Finally, during latency I, cell division of infected memory B cells occurs, the weakly immunogenic EBNA1 is expressed to ensure latent viral genome replication and its persistence within daughter cells [18].

1.1.2. Lytic Cycle

Occasionally, following stimulation, infected memory B cells may be recruited into GC and then either reintegrate the memory cell reservoir or differentiate into plasma cells and reactivate the EBV lytic cycle. In healthy carriers, lytic reactivation is observed only in plasma cells [19]. It is characterized by sequential expression of lytic cycle proteins resulting in production of new infectious viruses and lysis of infected cells [7,13].

Studies of the defective EBV genome helped to identify a transcription factor encoded by the EBV *BZLF1* gene as the key actor in switching from latency to lytic phase [20]. This protein, named ZEBRA, Zta, Z, BZLF1 or EB-1, when expressed in latently infected cells, activates the entire EBV lytic cycle cascade [21]. ZEBRA also activates transcription of the second IE gene *BRLF1* coding for the RTA transcription factor. ZEBRA and RTA function synergistically to activate the early genes involved in metabolism and viral DNA replication and the late genes encoding for EBV structural proteins [4].

Thus, EBV has two tightly regulated latent and lytic phases characterized by specific gene expression patterns. However, there is evidence that both latent and lytic gene expression may be simultaneously present within the same cell. *BZLF1* expression in freshly infected B cells starts as early as 1.5 h post-infection and lasts for several days. In these cells, transcription of the late gene *BLLF1* was not detected suggesting a partial activation of the lytic cycle [22]. This stage, characterized by IE and early gene expression without production of new virions or cell lysis, is commonly referred to as an abortive lytic cycle [23,24] or transient pre-latent abortive lytic cycle when it occurs immediately after infection [25]. Only a minority of EBV-infected B lymphocytes from healthy carriers completes the lytic cycle after stimulation, the vast majority generating an abortive lytic cycle [26]. However, how this abortive lytic cycle takes place in vivo remains unclear.

1.2. EBV-Related Oncogenesis

Despite its asymptomatic persistence in most of the adult population worldwide, in a minority of individuals, EBV is strongly associated with several non-malignant diseases such as infectious mononucleosis, chronic active infection, hemophagocytic lymphohistiocytosis, oral hairy leukoplakia and autoimmune diseases [2,27]. The vast majority of EBV-associated diseases are however represented by cancers occurring both in immunocompetent hosts (Table 1) and in patients with primary or acquired immunodeficiency (Table 2). They are mostly B cell malignancies (BL, HL, PTL, diffuse large B

cell lymphoma (DLBCL)), nasopharyngeal carcinoma (NPC) or, less frequently, T cell malignancies, gastric, breast and hepatocellular carcinomas, leiomyosarcoma and follicular dendritic sarcoma [1,2,28]. Many mechanisms of EBV related oncogenesis have been proposed and a possible role for different EBV components has been described (reviewed in [7,27,29–32]). Nevertheless, even if great progress has been made in understanding the EBV links to cancers, many aspects of EBV-related oncogenesis are still unknown and represent a major challenge in cancer research.

Table 1. EBV-associated malignancies in immunocompetent hosts and corresponding EBV association frequency and latent gene expression pattern.

Diseases	% EBV Association	Latency Type ^a
B-cells malignancies		
Burkitt Lymphoma		
• <i>Endemic BL</i>	>95%	I
• <i>Sporadic BL</i>	20–80%	I
Classical Hodgkin Lymphoma	20–90%	II
Diffuse Large B Cells Lymphoma (DLBCL)		
• <i>EBV+ DLBCL Not Otherwise Specified (NOS)</i>	100%	III
• <i>Pyothorax associated Lymphoma (PAL)</i>	100%	III
T/NK cells malignancies		
Extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type	>95%	I/II
Virus-associated hemophagocytic syndrome T-cell lymphoma	100%	I/II
Angioimmunoblastic T-cell Lymphoma (AITL) ^b	>80%	I/II
Hepatosplenic T-cell lymphoma		
Non-hepatosplenic $\gamma\delta$ T-cell lymphomas		
Enteropathy-type T-cell Lymphoma		
Epithelial malignancies		
Undifferentiated Nasopharyngeal carcinoma	100%	II
Gastric carcinoma	10%	II
Lymphoepithelioma-like carcinoma (salivary gland, tonsils, larynx, thymus, lungs, skin, uterus cervix, bladder, stomach)		
Breast carcinoma		
Hepatocellular carcinoma		
Mesenchymal malignancies		
Follicular dendritic cell sarcoma		

^a Latency type: Latency I = EBNA1, EBER 1 and 2, BART miRNA; Latency II = EBNA1, LMP1, 2A and 2B, EBER1 and 2, BART miRNA; Latency III = All EBNA1s, LMPs, EBERs and BART miRNA. ^b In AITL there is no EBV in tumor cells but EBV is nearly always present in tumor B cells, suggesting an indirect role of EBV [6,33]. Blank spaces indicate the missing data.

Table 2. EBV-associated malignancies in immunodeficient hosts and corresponding EBV association frequency and latent gene expression pattern.

Diseases	% EBV Association	Latency Type ^a
Acquired Immunodeficiency		
AIDS-associated B cell lymphomas		
• <i>BL</i>	30–50%	I
• <i>Hodgkin Lymphoma</i>	100%	II
• <i>DLBCL</i>		
○ Immunoblastic	70–100%	II/III
○ Non Immunoblastic	10–30%	II/III
○ Central Nervous System lymphoma (CNS)	>95%	II/III
○ Primary Effusion Lymphoma (PEL)	70–90%	I
○ Plasmablastic lymphoma	60–75%	I
Post-transplantation lymphoproliferative disorder	>90%	III
Lymphomatoid granulomatosis		
Methotrexate-associated B cell lymphoma		
Leiomyosarcoma		

Table 2. Cont.

Diseases	% EBV Association	Latency Type ^a
Congenital immunodeficiency		
Severe combined immunodeficiency-associated B cell lymphoma		
Wiskott-Aldrich syndrome-associated B cell lymphomas		
X-linked lymphoproliferative disorder-associated B cell lymphomas		

^a Latency type: Latency I=EBNA1, EBER 1 and 2, BART miRNA; Latency II=EBNA1, LMP1, 2A and 2B, EBER1 and 2, BART miRNA; Latency III=All EBNA1s, LMPs, EBERs and BART miRNA. Blank spaces indicate the missing data.

EBV genome contains approximately a hundred genes coding for latency and lytic cycle proteins and many small non-coding RNAs expressed to ensure the normal life cycle of the virus. Expression of some proteins and RNAs have been correlated with development of EBV-associated malignancies. The oncogenic properties of each EBV latent protein has been extensively explored (reviewed in [1,2,7]); however the involvement of EBV lytic cycle in oncogenesis is no less important than the contribution of individual proteins. Even though the lytic cycle was long assumed to inhibit tumorigenesis due to final lysis of the infected cells, an increasing amount of data support its contribution to oncogenesis mainly at its initiation or through the abortive lytic cycle and/or autocrine or paracrine effects of EBV IE proteins [27,34,35]. ZEBRA could thus be seen as an important player in EBV-driven oncogenesis, in collaboration with other viral and cellular proteins since it induces the lytic cycle. Additionally, ZEBRA can exit EBV-infected cells either by secretion or after cell lysis and potentially penetrate other cells through its cell penetration domain (CPD) [36]. In EBV-infected cells, ZEBRA alone can switch EBV from latency to lytic cycle; therefore, it may transduce reactivation signals between infected cells. ZEBRA can also reactivate transcriptionally silent host genes due to its affinity to methylated promoters [37] and thus affect key cellular pathways implicated in oncogenesis, control of cell cycle, proliferation and apoptosis.

We will next discuss the structural and biological properties of ZEBRA to provide insights into its potential oncogenic activity and clinical applications.

2. ZEBRA Structure and Functions

2.1. ZEBRA Domain Organisation

ZEBRA is encoded by the EBV *BZLF1* gene, transcribed to a mRNA composed of three exons and translated into a 27 kDa protein containing 245 amino acids (Figure 2A).

ZEBRA belongs to the family of basic leucine zipper (bZIP) transcription factors. Its bZIP domain (residues 175–221) consists of the central basic DNA binding domain (DBD, residues 178–194) and the C-terminal coiled-coil dimerization domain (DD, residues 195–221) [38,39]. ZEBRA homodimer grasps DNA via its two long helices, with the DBD contacting the major groove and DD forming a coiled coil. A185 and S186 of ZEBRA directly interact with methylated cytosines in DNA [37].

Unlike eukaryotic bZIP factors, ZEBRA lacks a classical heptad repeat of the leucine zipper motif [40], but its bZIP domain is additionally stabilized by the C-terminal tail, which makes a turn and runs antiparallel to the coiled coil [39]. Residues 167–177 are considered as the “regulatory domain” and their phosphorylation can modulate ZEBRA activity [38,41].

In the N-terminal transactivation domain (TAD, residues 1–166), the residues 52–64 and 77–86 are rather unstructured and amorphous [42,43] (Figure 2A). The basic region within TAD (residues 157–161) is considered to be important for recognition and high affinity binding to methylated DNA [44].

ZEBRA can exit and enter cells and nuclei due to its CPD situated within the bZIP domain between residues 170 and 220 [36]. This CPD was successfully used to transduce human cells in vitro [36,45]. CPDs are short sequences with a composition that enables them (and the adjacent protein) to penetrate cells either via endocytotic entry followed by endosomal escape, or by directly penetrating the cell

membrane. Their composition is usually either cationic (with a high number of positively charged residues) or amphipathic (with hydrophilic and hydrophobic regions of residues) [46]. ZEBRA CPD is rich in positively charged residues (seven lysines and seven arginines), mostly within DBD (basic region) (Figure S1A in blue), whereas hydrophobic amino acids (one valine, five alanines, seven leucines) of CPD are mostly within DD (leucine zipper) (Figure S1B in red) [36]. In another protein possessing the CPD, human immunodeficiency virus (HIV)-1 Tat, the CPD region is also multifunctional [47]. Presumably, the cationic part serves for interaction with the negatively charged phosphate groups of membrane phospholipids as well as on DNA, while hydrophobic residues interact with the hydrophobic part of the phospholipid membrane and participate in ZEBRA's dimerization (Figure S1C).

When entering cells, ZEBRA is targeted to the nucleus and has a pan-nuclear localization, with the exception of the nucleolus [48]. Substitution of several amino acids within DBD can alter subnuclear localization from pan-nuclear to focal [49]. The bipartite nuclear localization sequence of ZEBRA is located within DBD (residues 178-194), but a small region within TAD (residues 157-162) is also important for the nuclear import [50].

To summarize, ZEBRA structure accounts for its important functions because the chromatin-binding capacity via its DBD and DD and its ability to act as a transcriptional activator thanks to its TAD allows it to regulate expression of both viral and host genes [36,51]. ZEBRA also possesses a CPD that allows it to penetrate into uninfected cells [36].

2.2. Posttranslational Modifications of ZEBRA

ZEBRA is prone to posttranslational modifications. It is constitutively phosphorylated *in vivo* at multiple sites mostly clustered within TAD and the regulatory domain [52]. Phosphorylation of S173 and to a lesser extent S167 within the regulatory domain is important for DNA binding [41,53]. Constitutive phosphorylation may also explain why ZEBRA's apparent mass on gel electrophoresis is 35 kDa [40] instead of the predicted 27 kDa [54].

ZEBRA also has a sustained N-terminal M1 acetylation [55]. K12 of ZEBRA is a substrate of partial and reversible SUMOylation [56,57] that affects neither protein stability nor its subcellular localization but significantly decreases ZEBRA transactivation activity by inhibiting its binding to CBP (CREB-binding protein) (see below) [57,58]. SUMOylation is diminished in DD-deficient ZEBRA [57]; EBV-encoded protein kinase also reduces ZEBRA's SUMOylation, and this effect is not related to S209 phosphorylation, conventional site of ZEBRA modification by this kinase [59].

Thus, ZEBRA is extensively and mostly constitutively modified after translation, presumably by certain viral and host enzymes. The regulation of posttranslational modifications, their role and possible regulatory potential for ZEBRA activity and the EBV status remain to be elucidated.

2.3. ZEBRA Functioning in Host Cells

ZEBRA functions in host cells rely on its capacity to bind specific DNA motifs and interact with other proteins. DBD of ZEBRA binds to heptamer DNA motifs, named ZEBRA response elements (ZREs). ZREs are present within both viral and host gene promoters. At present, two types of ZREs are identified: an activator protein 1 (AP-1)-like recognition elements (non-CpG-containing) [40] and CpG-containing recognition elements [60] (Figure 2B). Binding to CpG-ZREs depends on DNA methylation [60,61]. During latency, EBV genome becomes heavily methylated to suppress its transcription, however, ZEBRA binds methylated promoters with high affinity and activates gene transcription to initiate lytic cascade [44]. ZEBRA's selectivity and preference for methylated DNA is a key to hijacking host epigenetic silencing, which is important for EBV latency reversal, oncogenesis, control of cell cycle, proliferation and apoptosis [37]. Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase that reduces ZEBRA binding to methylated promoters [37] can be considered as ZEBRA host restriction factor.

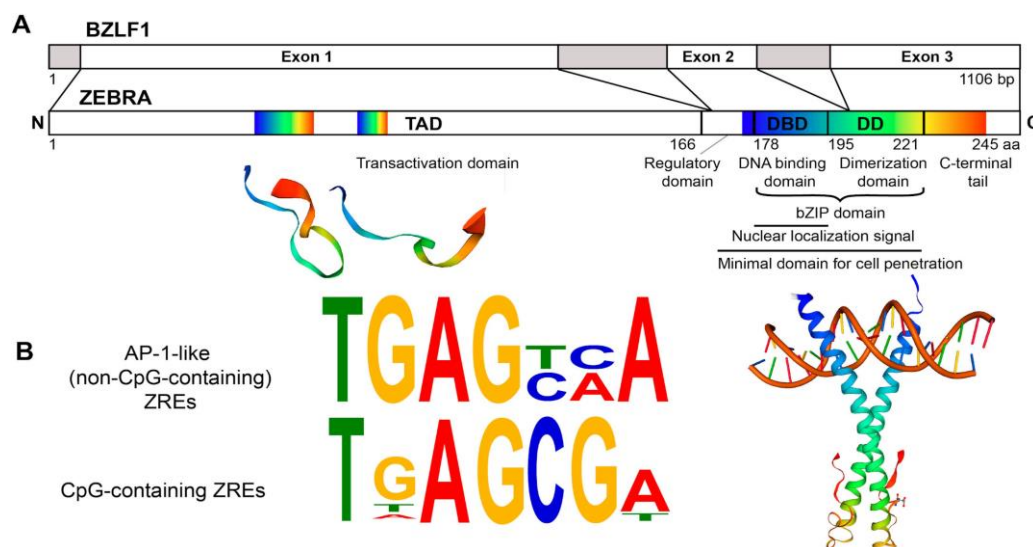


Figure 2. Structure of the ZEBRA protein. (A) ZEBRA structure. ZEBRA is encoded by the *BZLF1* gene containing three exons. ZEBRA protein has an N-terminal transactivation domain (TAD, residues 1–166), a regulatory domain (residues 167–177), a bZIP domain, which consists of a central basic DNA binding domain (DBD, residues 178–194) and a C-terminal coiled-coil dimerization domain (DD, residues 195–221). The minimal domain for cell penetration is located between residues 170–220. Three available partial 3D structures were imported from the SWISS-MODEL Repository [62] (accession number P03206) and are based on crystal structure data published by [39,42,43]. They are shown below the respective primary sequence. Rainbow color code is used to map approximate residue position concordance between primary and tertiary (or quaternary) structure. (B) ZEBRA-response elements (ZREs). Sequences of ZEBRA DNA binding sites (ZREs) of two types: AP-1-like (non-CpG-containing) ZREs and CpG-containing ZREs are depicted as sequence logos, adapted from [51,60].

2.3.1. Transcriptional Regulation

ZEBRA can both activate and downregulate transcription of viral and host genes. Transcriptomic analysis of B cells with ectopic expression of ZEBRA revealed 2263 deregulated genes (74% upregulated, 26% downregulated) [49]. Upregulated genes include those involved in cell adhesion, morphogenesis, projection and response to hormones, while downregulated genes are involved in the immune response, induction of apoptosis and lymphocyte activation [49]. In total, 12% of these genes (207 upregulated and 71 downregulated) are directly regulated by ZEBRA which binds to their promoters, as identified by chromatin immunoprecipitation followed by sequencing (ChIP-seq).

During activation of lytic cycle, ZEBRA binds promoters of early lytic viral genes and host genes and, via its TAD, interacts with basal transcription factors IID [63] and IIA [64] (TFIID and TFIIA); this leads to sequential recruitment of other basal transcription factors and RNA polymerase II (Figure 3A). In addition, ZEBRA binds the transcriptional coactivator and histone acetyltransferase CBP (CREB binding protein) which increases ZEBRA transactivation properties [65]. Direct binding to the Transducer of Regulated CREB coactivator enhances ZEBRA-mediated transcription [66].

Transcriptional repression by ZEBRA is related to its specific binding to cellular transcription factors mainly via its bZIP or TAD. In most cases, such interaction mutually impedes their function as transcription factors and results in repression of target genes for both ZEBRA and the associated transcription factors [67,68].

Direct binding to p53 [69,70], p65 [71] and c/EBP family of transcription factors [68] inhibits their transcriptional activity. ZEBRA directly binds B cell specific transcription factors Pax5 and Oct2 via bZIP domain; this inhibits ZEBRA activity, however, the reciprocal inhibition was proven only for Pax5 [72,73]. Unidirectional inactivation of the family of nuclear factor of activated T cells (NFAT) transcription factors, involved in calcium signal transduction, by direct interaction with ZEBRA was

also reported [74]. Presumably, the same mechanism related to ZEBRA inhibitory binding to host transcriptional factor is involved in the class II transactivator (CIITA) repression, however, it involves the TAD and a transcriptional factor inhibited by ZEBRA was not identified [67]. ZEBRA also binds to interferon regulatory factor 7 (IRF-7) through its TAD, decreasing the transcription of interferon (*IFN*) $\alpha 4$, *IFN* β , and antigen presentation 2 (*Tap-2*) [75]. Finally, SUMOylation of ZEBRA appears to be important for transcriptional repression since it promotes recruitment of histone deacetylases to responsive promoters [57] (Figure 3B).

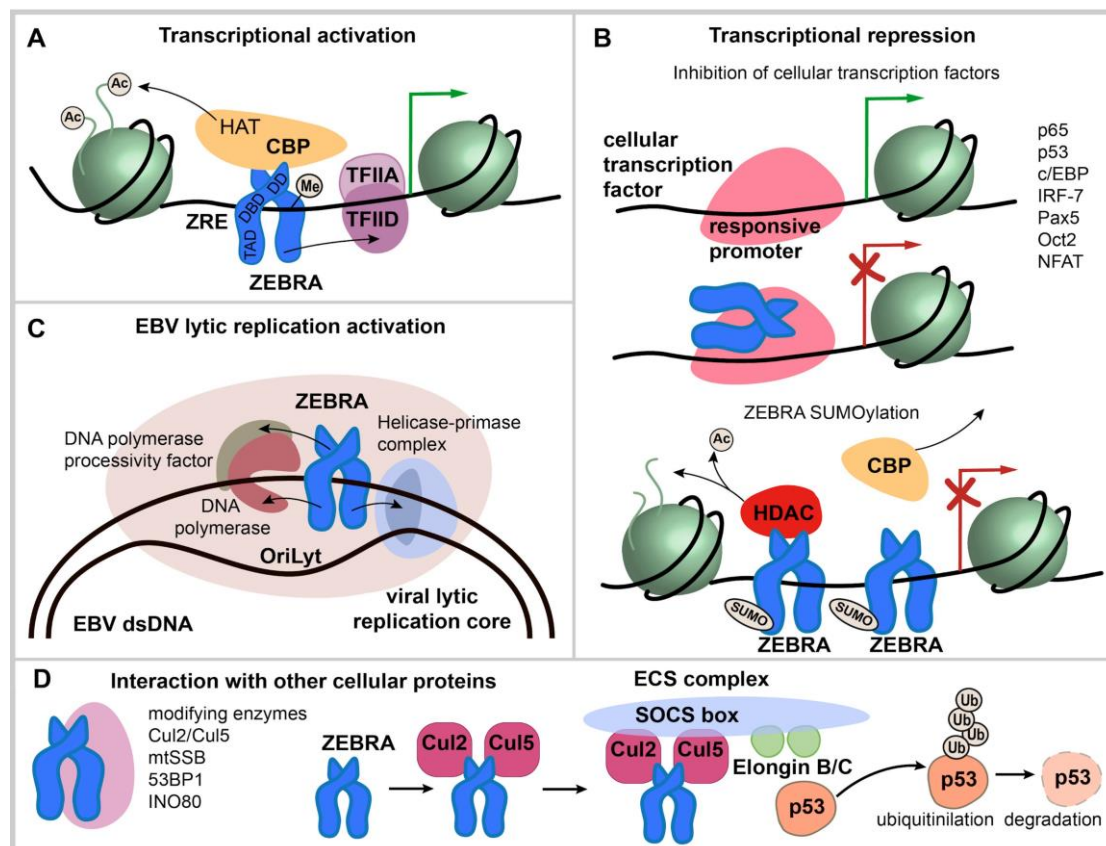


Figure 3. ZEBRA functions. (A) transcriptional activation by ZEBRA. ZEBRA is shown as a homodimer, relative positions of transactivation domain (TAD), DNA binding domain (DBD) and dimerization domain (DD) are indicated. ZEBRA binds to specific ZEBRA response elements (ZREs) within promoters of viral and host genes with a preference to methylated-CpG DNA. ZEBRA binding leads to sequential recruitment of basal transcription factors and RNA polymerase II. In addition, ZEBRA binds transcriptional coactivator CREB binding protein (CBP). (B) transcriptional repression via ZEBRA binding to cellular transcription factors and by SUMOylated ZEBRA. Transcription factors that interact directly with ZEBRA are listed. The interaction occurs mainly via ZEBRA's bZIP domain and mutually impedes the function of both ZEBRA and bound transcription factor and results in repression of targeted genes. SUMOylated ZEBRA has a low transactivation activity related to decreased CBP binding and the ability to recruit histone deacetylases (HDAC) to responsive promoters. (C) activation of EBV lytic replication. ZEBRA recognizes the EBV lytic origin (oriLyt), serves as the origin binding protein and recruits viral core replication enzymes to initiate lytic replication of EBV. (D) interaction with cellular proteins not directly involved in transcriptional regulation. ZEBRA interaction partners are listed. ZEBRA interaction with Cul2/Cul5 induces the formation of multimolecular ECS complex (Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein) with the ubiquitin ligase activity that targets p53 for proteasomal degradation.

2.3.2. Binding to the Replication Origin in EBV Lytic Replication

During the lytic cycle, ZEBRA binds EBV lytic origin (oriLyt) and recruits viral core replication enzymes to initiate replication [76,77] (Figure 3C). In contrast to latent replication, EBV lytic replication relies on virally encoded replication enzymes, whose expression is induced during the lytic cycle: helicase (*BBLF4*), primase (*BSLF1*), primase-associated factor (*BBLF2/3*), DNA polymerase (*BALF5*), DNA polymerase processivity factor (*BMRF1*), and single-stranded DNA binding protein (*BALF2*) [41]. This function is mediated by the TAD (residues 11–25), which interacts with the viral helicase, primase and DNA polymerase [78,79]; and by the bZIP domain which interacts with the DNA polymerase processivity factor [41]. S173 phosphorylation within the regulatory domain is essential for ZEBRA action as a replication factor [41].

2.3.3. Interaction with Other Cellular Proteins

ZEBRA also interacts with proteins other than transcription factors (Figure 3D). For example, ZEBRA interaction with Cul2 and Cul5 induces the formation of the multimolecular ECS complex (Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein) that ubiquitinates p53 for proteasomal degradation [80].

Other ZEBRA cellular partners include mitochondrial single-stranded DNA binding protein (mtSSB) [81], nuclear protein 53BP1, a component of the ATM DNA damage response pathway [82], INO80 chromatin remodeler ATPase [83]; these interactions are important for EBV lytic cycle reactivation and replication.

In summary, ZEBRA binds specific DNA motifs and/or interacts with other proteins, either recruiting them to DNA binding sites or altering their activity. However, ZEBRA direct interactions with many other cellular proteins [74] are much less studied as compared to interaction with chromatin-binding proteins.

3. EBV-Related Diseases and Oncogenic Properties of ZEBRA

3.1. ZEBRA Implication in EBV-Related Malignancies

Increasing evidence supports that *BZLF1* gene expression could contribute, directly or indirectly, to EBV-induced tumorigenesis. ZEBRA protein and mRNA were detected in more than 80% of biopsies from 44 PTLD patients [84]. Lymphoblastoid cell lines (LCLs) derived with wild-type (WT) EBV are more prone to induce a lymphoproliferative disorder when injected into Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice than LCLs derived with *BZLF1*-KO EBV [85]. Interestingly, the same results were observed after acyclovir treatment, which inhibits viral DNA replication but not *BZLF1* expression. These data suggest that ZEBRA, and not the production of infectious viral particles, is required for tumor formation in SCID mice [85]. These results were also confirmed in a humanized mouse model where both human fetal CD34+hematopoietic stem cells and human thymus/liver tissues were transplanted. Indeed, in this model, the development of CD20+ DLBCL was more frequent in mice infected with WT EBV as compared to *BZLF1*-KO EBV [86]. Soluble ZEBRA can be detected in the serum of PTLD patients at concentrations up to 4 µg/mL and it is significantly higher in PTLD patients compared to transplanted patients without PTLD [87]. ZEBRA is also present in serum samples from immunocompromised humanized mice developing lymphoma, with a correlation with tumor mass [35]. The presence of ZEBRA protein or its mRNA was also reported in tumor cells or in tumor tissue biopsies in other types of EBV-induced lymphomas, such as HL, DLBCL and BL [88–91].

In some EBV-associated lymphoma, there is also evidence for indirect action of ZEBRA. *BHRF1* and *BALF1*, two EBV early lytic genes whose expression is induced by ZEBRA, are found highly expressed in DLBCL [89]. The products of these two genes are the viral Bcl-2 homologs required for B cells immortalization [92]. Moreover, EBV cofactors for endemic BL (*Plasmodium falciparum*, *Euphorbia tirucalli* and potentially Aflatoxin B1) are all able to reactivate EBV in vitro and in vivo [93–95].

High ZEBRA expression at mRNA or protein level was also reported in NPC biopsies [96,97] and in breast carcinoma [98]. High anti-ZEBRA IgG titers in sera correlate with poorer clinical outcome in

patients [99,100]. The presence of anti-ZEBRA antibody has a high diagnostic accuracy for early-stage NPC [101]. More generally, EBV replication and expression of some early lytic cycle genes were detected in EBV-induced epithelial malignancies including NPC [102,103]. In addition, EBV-infected individuals with elevated titers of IgA antibodies against EBV lytic viral capsid antigen (VCA) have a higher risk of NPC [104]. A subset of EBV-associated gastric carcinoma and some NPC cells also express early lytic genes such as *BHRF1*, *BALF1*, *BARF1* and *BGLF5* [105–108]. A specific EBV strain isolated from NPC and gastric carcinoma has an enhanced capacity for spontaneous lytic replication and therefore ZEBRA expression [109,110].

3.2. ZEBRA Oncogenic Properties

In this section, we will discuss the mechanism by which ZEBRA contributes to acquisition of cancer hallmarks by cells (Figure 4).

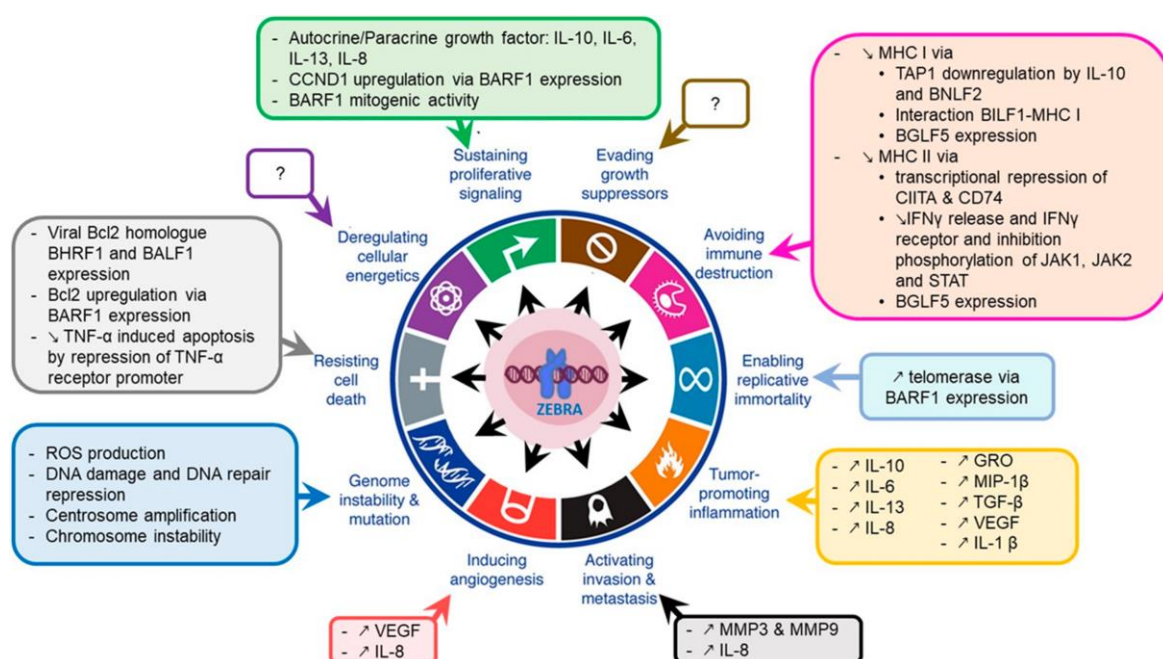


Figure 4. ZEBRA oncogenic properties. ZEBRA directly, or through its target genes, contributes to the acquisition of cancer hallmarks by cells including sustained proliferative signaling, evading or altering the immune response, resisting cell death, enabling replicative immortality, inducing angiogenesis and activating tumor invasion and metastasis. A part of these effects is mediated by genome instability and tumor-promoting inflammation that induce an environment favorable to cancer development and progression. Adapted from [111].

3.2.1. Genome Instability

Genome instability (GI), one of the major factors of oncogenic transformation, may result in random mutations and chromosomal rearrangements which can confer selective advantage to certain cells through oncogene activation, downregulation or loss of tumor suppressor genes [111]. GI can occur through different mechanisms: (1) DNA damage production with incapacity to detect damaged DNA; (2) DNA damage with defects in DNA repair; (3) defects in preventing the action of potential mutagens [112–114].

Although ZEBRA can interact with proteins implicated in DNA damage response (e.g., 53BP1, a component of the ATM pathway) [82], not much data exist in support of a direct relationship between GI and ZEBRA. However, some events such as oxidative stress that lead to GI occur following EBV reactivation and can thus be related to ZEBRA expression [115,116]. Oxidative stress was also described in purified B cells and epithelial cells at an early stage of EBV infection when ZEBRA is expressed [117].

Furthermore, several early lytic proteins induced by ZEBRA may participate in GI. For example, BMRF1 induces centrosome amplification and chromosome instability in B cells in vitro and in vivo in a mouse model [118]. BGLF4 directly or indirectly induces DNA damage by retarding cellular S-phase progression or inducing premature chromosome condensation associated with a high risk of chromosomal breaks at common fragile sites [119–121]. EBV DNase was also found to induce GI in human epithelial cells through DNA damage induction and DNA repair repression [122]. BALF3 has also been linked to DNA strand breaks induction, resulting in copy number aberrations accumulation in NPC cells [123]. Recurrent chemical reactivation of EBV in NPC cells appears to induce GI [124]. EBV reactivation in LCLs induces global nuclear architecture remodeling that could enhance formation of chromosomal translocations [125].

3.2.2. Tumor-Promoting Inflammation

Inflammation favors tumor development and progression. This could be related to high levels of cytokines, chemokines and growth factors observed upon EBV reactivation, including interleukin (IL)-8, IL-10, IL-6, IL-13, Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) [25]. ZEBRA can also directly transactivate *IL-8* promoter through its two ZREs, resulting in *IL-8* upregulation in NPC cells [126]. ZEBRA expression in NPC is also associated with upregulation of growth related oncogene and macrophage inflammatory protein-1 β [126].

ZEBRA can also bind directly to the human IL-10 (*hIL-10*) minimal promoter to induce transcription of *hIL-10* during the early phase of the lytic cycle in EBV-infected B cells [127]. IL-10 is upregulated in breast cancer and NPC [127–129]. A viral analog of the hIL-10 (vIL-10) encoded by the *BCRF1* gene can be produced during the lytic cycle [130].

Other interleukin genes contain ZREs in their promoters [25] and IL-6 and IL-13 production can be directly activated by ZEBRA in infected cells [131–133]. ZEBRA also increases expression of the genes coding for TGF- β [134] and the Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [135] in B cells undergoing lytic cycle. Finally, ZEBRA can also induce inflammatory cytokines through expression of the early lytic gene *BLLF3*, which can activate NF- κ B and induce secretion of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and IL-10) in human monocyte-derived macrophages [136,137].

3.2.3. Immune Evasion

ZEBRA-induced viral and human IL-10 production protects infected cells from immune recognition and elimination. Indeed, IL-10 interferes with antiviral cytokines and NK/NKT cell-mediated lysis [130]. Moreover, IL-10 downregulates transporter proteins associated with TAP1 and consequently induces a reduction of surface MHC I molecules on infected B lymphocytes [138]. IL-10 also inhibits IFN γ release which plays a central role in resistance of the host to infection [139].

ZEBRA also promotes immune evasion by disrupting cell signaling pathways activated by IFN γ such as the JAK-STAT pathway. It decreases IFN γ receptor expression and inhibits phosphorylation of Jak1, Jak2 and STAT1 molecules consequently downregulating their downstream target genes, including *MHC II* [140]. ZEBRA can also directly thwart surface expression of MHC II molecules by transcriptional repression of *CIITA*, a main regulator of human leukocyte antigen (HLA) class II genes [141] and *CD74*, the invariant chain of MHC II that facilitates its transport to the cell surface [142].

The immunomodulatory effects can be induced by three EBV lytic cycle proteins called immunoevasins (*BILF1*, *BNLF2a* and *BGLF5*). They interfere with host antigen processing pathways and consequently allow EBV-infected cells to escape from immune system action. *BILF1* reduces MHC I molecules on the cell surface by physical interaction and inhibits CD8 $^{+}$ T cell recognition of endogenous target antigens [143,144]. *BNLF2*, a TAP inhibitor, impairs peptide loading onto HLA class I molecules thus blocking antigen presentation to cytotoxic T cells [130,145]. *BGLF5*, the EBV alkaline exonuclease, downregulates HLA class I and II impairing antigen recognition by immune cells [146].

It is noteworthy that the described immunomodulatory effects induced by ZEBRA are associated not only with cancer progression but also with development of autoimmune diseases, e.g., systemic lupus erythematosus [147].

3.2.4. Cell Proliferation and Growth

ZEBRA-induced IL-10 enhances the viability of resting B lymphocytes and supports growth and differentiation of EBV-infected cells [127,139]. Both IL-6 and IL-13 promote proliferation of EBV-infected cells and long term growth of LCLs [131,133]. In agreement with this, growth of both LCLs and EBV-induced B cells after primary infection can be inhibited by treatment with an anti-IL-13 antibody [133]. Treatment with an anti-IL-6 antibody led to remission of B-lymphoproliferative disorder in eight out of 12 patients studied [148].

ZEBRA-induced IL-8 may be used by some tumor cells as an autocrine growth factor [149]. The early lytic gene *BARF1* also possesses an autocrine mitogenic activity and is an *in vivo* growth factor [150]. *BARF1* is associated with Cyclin D1 overexpression in EBV-associated gastric cancer [151].

3.2.5. Resistance to Cell Death

The most common anti-apoptotic effect following ZEBRA expression is through activation of the two viral Bcl-2 homologs *BHRF1* and *BALF1*. Another EBV early lytic gene, *BARF1*, can activate the cellular anti-apoptotic protein Bcl-2 in fibroblasts [152]. *BARF1* expression leads to an increased Bcl-2 and Bax ratio and decreased PARP cleavage in gastric carcinoma cells [153].

BZLF1-KOLCLs showed a significant increase in the percentage of dead cells, reversible after *BZLF1* expression, whereas no difference was observed between *BRLF1*-KO and WT LCLs, thus suggesting a direct ZEBRA-mediated anti-apoptotic effect [85]. ZEBRA also downregulates the expression of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) by direct binding to its promoter [68,154]. This prevents TNF- α activation and consequently TNF- α induced apoptosis.

3.2.6. Other Oncogenic Effects

ZEBRA can positively affect tumor progression by inducing the expression of *VEGF* and *IL-8*, both associated with angiogenesis, tumor development, metastasis and resistance to chemotherapy [135,155,156]. Moreover, expression of ZEBRA by tumor cells from NPC patients correlates with advanced lymph node metastasis, and this effect has been related to direct transactivation of the Matrix Metalloproteinase (*MMP9*) promoter by ZEBRA [157]. In addition to *MMP9*, ZEBRA can also induce *MMP3* upregulation in epithelial cells by binding to the ZRE in the *MMP3* promoter. Both *MMP3* and *MMP9* act in synergy to promote tumor invasion and metastasis [158]. The oncogenic early lytic gene *BARF1* enables replicative immortality through induced activation of telomerase in primary epithelial cells [159].

ZEBRA, through its bZIP domain, can also directly interact with cancer-associated transcription factors: p53, RAR, CBP, and C/EBP α [160–163]. These interactions have a functional importance for EBV life cycle, but a direct demonstration for their role in human disease is still lacking even if these ZEBRA targets are often deregulated in cancers [164,165].

Interestingly, ZEBRA has a functional homology with another viral protein: the HIV-1 transactivator protein Tat. Like ZEBRA, Tat can be secreted into the bloodstream by HIV-1 infected T cells and, through its cell penetration domain, can enter uninfected cells, including B cells. Tat protein is potentially oncogenic in B cells since it induces a relocation in the nuclear space of the *MYC* locus close to the *IGH* gene in circulating B-cells [166] and an overexpression of the *AICDA* gene coding for the Activation-induced Deaminase (AID) [167]. These two events promote formation of BL-specific translocations and could at least partly account for the high frequency of BL in HIV-infected patients. Tat also promotes mitochondrial production of reactive oxygen species (ROS) and thus DNA damage and genome instability in B cells [168]. Interestingly, ZEBRA and Tat can be present in a cell at the same time in the blood of HIV-infected individuals and possibly interact. This hypothetical interaction could have an antagonistic or synergistic effect on their oncogenic activity.

4. ZEBRA in Diagnosis and Therapy

Many articles report the presence of EBV lytic cycle in tumor cells from HL [169], NPC [99,170–174], in transplant patients [175], and in breast tumors [98]. Clinical studies on EBV lytic proteins including ZEBRA in patients with PTLD or HIV-associated non-Hodgkin lymphoma NHL are mostly related to the role of these proteins in neoplastic tissues [84,89,176,177]. Both high EBV copy number and strong *BZLF1* mRNA expression in the peripheral blood lymphocytes (PBL) of patients are sensitive markers of EBV-related PTLD [178]. ZEBRA was expressed in 5% of whole peripheral blood mononuclear cells from a patient with a lymphoproliferative disease who underwent non-myeloablative allogeneic stem cell transplantation [179]. Moreover, the number of EBV-infected cells in the peripheral blood increases after immunosuppression: on average, 1.6 latently-infected cells per 10^4 B lymphocytes [180] vs. 12.5 per 10^6 B cells in persistently infected healthy individuals [181].

Soluble ZEBRA concentrations of >100 ng/mL detected by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in serum of patients after solid organ or hematopoietic stem cell transplant were predictive of PTLD in 80% of the cases within three weeks [87]. Interestingly, the circulating ZEBRA could be detected during periods in which the viral DNA was not detectable by qPCR. For example, in two patients, ZEBRA was detected at 2 and 6 weeks, respectively, prior to the PTLD episode and before an increase in qPCR signals. Thus, ZEBRA testing in serum could help identify patients likely to develop severe outcomes during the critical posttransplant period and serve as a potential diagnostic marker for EBV follow-up in immunocompromised patients.

The relevance of EBV lytic cycle to human pathology prompted researchers to target certain lytic proteins with therapeutic aims. Adenovirus vectors expressing *BZLF1* or *BRLF1* were used to treat EBV-positive tumors [182]. On the other hand, Food and Drug Administration (FDA)-approved leflunomide, which targets EBV replication, was shown to inhibit the earliest step of lytic EBV reactivation (*BZLF1* and *BMRF1* expression) and prevented the development of EBV-induced lymphomas in both a humanized mouse model and a xenograft model [183]. More recently, duvelisib (a molecule inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway, and B cell receptor (BCR) signaling) was shown to reduce cell growth and expression of EBV lytic genes *BZLF1* and *gp350/220* in EBV-positive cell lines [184]. The histone deacetylase (HDAC) and DNA methyltransferase inhibitors are also possible avenues to suppress the ZEBRA expression and the entire lytic cascade [185].

Immunotherapeutic approaches, such as vaccination against IE proteins or IE-specific therapeutic monoclonal antibodies also represent a promising approach. A recent study demonstrated that vaccination of hu-PBL-SCID mice against ZEBRA could enhance specific cellular immunity and significantly delay the development of the lethal EBV-related lymphoproliferative disease [186].

5. Conclusions and Remaining Questions

The role of ZEBRA in EBV infection, lytic cycle and oncogenesis has been extensively studied, but numerous questions remain:

Abortive lytic cycle: ZEBRA can affect host cells by inducing the abortive lytic cycle in B cells (production of early EBV lytic proteins without cell lysis); however the fate of these cells remains unclear: they may reintegrate the memory cell reservoir after the abortive lytic cycle, return to latency 0 profile or restart the latency cycle as for the primary infection (Figure 1). Another remaining question is whether some stimuli are more prone than others to specifically induce the abortive lytic cycle. *In vitro*, EBV reactivation stimuli such as stress inducing agents, ROS, anticancer drugs or hypoxia [14,187] directly reactivate the virus in EBV-positive cell lines. Thus, *in vivo*, the abortive lytic cycle may occur after stimulation by these stress-induced agents, instead of an immunological stimulation which mainly leads to a productive lytic cycle in plasma cells.

A role of ZEBRA in oncogenesis: ZEBRA upregulates the transcription of host cell genes coding for cytokines involved in inflammation, angiogenesis, metastasis and cell proliferation. ZEBRA downregulates the expression of MHC II class genes thus promoting the immune evasion and genes related to apoptosis thus inducing cell death resistance. ZEBRA also interacts with cancer-related

cellular proteins altering their activity. The net cellular effect of these interactions is quite complex and depends on protein localization, concentration, nuclear architecture, nature of promoters involved. Indeed, for p53 signaling pathway, both inhibitory and stimulatory effects of ZEBRA have been described [69,164,165]. This activity of ZEBRA needs additional studies.

A role of ZEBRA in non-infected cells: ZEBRA is released into the bloodstream by infected cells and, due to its CPD, can potentially penetrate into uninfected cells and alter their transcriptional program either directly or via interaction with cellular proteins. These potentially oncogenic effects of ZEBRA in non-infected cells are worth investigating and could link EBV to other as yet unidentified pathologies, independently of EBV presence in cells, thus potentially expanding the spectrum of EBV-associated diseases.

ZEBRA interaction with other proteins: the cellular interactome of ZEBRA needs further investigation to explain the functional significance of ZEBRA interaction network [74]. ZEBRA is extensively modified in vivo [52], however, the enzymes (viral and cellular) and signaling pathways involved in its post-translational modifications are largely unknown, as well as the effect of these modifications on ZEBRA activity. A splicing variant of ZEBRA was also described but its functional role is poorly understood [188]. Some EBV strains as well as sequence variations in the *BZLF1* gene may have an enhanced ability to reactivate the lytic cycle [109,110,189]. A better characterization of the variations in the structure of the ZEBRA protein produced by these different virus strains could be relevant.

The relevance of the lytic cycle and the role of ZEBRA in lymphomagenesis is a new paradigm pertaining to the prevention and treatment strategies for EBV-associated cancers. It is therefore important to investigate the lytic EBV infection in immunocompromised patients, such as organ transplant recipients, who are highly prone to developing EBV-associated malignancies. More efforts should be invested to examine the potential of drugs that target EBV lytic proteins, including ZEBRA.

ZEBRA as a biomarker (mRNA, anti-ZEBRA IgG and soluble ZEBRA concentration in blood) has mainly been studied in PTLT. It would be important to test whether circulating ZEBRA could serve as a biomarker for other EBV-associated diseases, especially those with the lytic cycle involvement, e.g., endemic BL.

A better understanding of the mechanisms underlying ZEBRA activity in cells will shed light on its role in oncogenesis and open perspectives in early diagnosis and treatment of EBV-related cancers.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/6/1479/s1>, Figure S1: ZEBRA cell penetration domain.

Funding: The work in the laboratory was supported by INCa, ANRS, INSERM (ENVIBURKITT), the Presidium of RAS and the state program of fundamental scientific research of IDB RAS.

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

Abbreviations

AID	activation-induced deaminase
AIDS	acute immunodeficiency syndrome
AITL	angioimmunoblastic T cell lymphoma
AP-1	activator protein 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
BALF	BamHI-A fragment leftward open reading frame
BARF	BamHI-A fragment rightward open reading frame
BART	BamHI-A fragment rightward transcript
BGLF	BamHI-G fragment leftward open reading frame
BHRF	BamHI-H fragment rightward open reading frame
BILF	BamHI-I fragment leftward open reading frame
BL	Burkitt's lymphoma
BLLF	BamHI-L fragment leftward open reading frame

BMRF	BamHI-M fragment rightward open reading frame
BNLF	BamHI-N fragment leftward open reading frame
bZIP	basic leucine zipper
BRLF	BamHI-R fragment leftward open reading frame
BZLF	BamHI-Z fragment leftward open reading frame
CNS	central nervous system
CPB	CREB binding protein
CPD	cell penetration domain
CR	complement receptors
DBD	DNA binding domain of ZEBRA
DD	dimerization domain of ZEBRA
DLBCL	diffuse large B cell lymphoma
EBER	EBV-encoded small RNA
eBL	endemic Burkitt's lymphoma
EBNA	EBV nuclear antigen
EBV	Epstein-Barr Virus
ECS	Elongin B/C-Cul2/5-SOCS-box protein
GC	germinal center
GI	genome instability
HDAC	histone deacetylases
hIL	human interleukin
HIV	human immunodeficiency virus
HL	Hodgkin lymphoma
HLA	human leukocyte antigen
IARC	international agency for research on cancer
IE	immediate early
IFN	interferon
IGH	immunoglobulin heavy chain
IL	interleukin
LCL	lymphoblastoid cell lines
LMP	latent membrane protein
MHC	major histocompatibility complex
MMP	matrix metalloproteinase
MYC	myelocytoma
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NFAT	nuclear factor activated T cells
NHL	non-hodgkin lymphoma
NK	natural killers
NLS	nuclear localization sequence
NOS	DLBCL not otherwise specified
NPC	nasopharyngeal carcinoma
PAL	pyothorax associated lymphoma
PBL	peripheral blood lymphocytes
PEL	primary effusion lymphoma
PTLD	post-transplant lymphoproliferative disorders
ROS	reactive oxygen species
SCID	severe combined immunodeficiency
SUMO-1	small ubiquitin-related modifier 1
TAD	transactivation domain of ZEBRA
TAP	transporter associated with antigen processing
TGF- β	tumor growth factor β
TNF	tumor necrosis factor
TNFR	tumor necrosis factor receptor

VEGF	vascular endothelial growth factor
vIL	viral interleukin
WT	wild type
ZRE	ZEBRA response elements

References

1. Dolcetti, R.; Dal Col, J.; Martorelli, D.; Carbone, A.; Klein, E. Interplay among viral antigens, cellular pathways and tumor microenvironment in the pathogenesis of EBV-driven lymphomas. *Semin. Cancer Biol.* **2013**, *23*, 441–456. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
2. Kutok, J.L.; Wang, F. Spectrum of Epstein-Barr Virus–Associated Diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **2006**, *1*, 375–404. [[CrossRef](#)]
3. Cohen, J.I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* **2000**, *343*, 481–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tsurumi, T.; Fujita, M.; Kudoh, A. Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev. Med. Virol.* **2005**, *15*, 3–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. IARC. Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi’s Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17–24 June 1997. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* **1997**, *70*, 1–492.
6. International Agency for Research on Cancer; Weltgesundheitsorganisation (Eds.) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 100 B, Biological Agents: This Publication Represents The Views And Expert Opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Which Met in Lyon, 24 February–03 March 2009*; IARC: Lyon, France, 2012; ISBN 978-92-832-1319-2.
7. Saha, A.; Robertson, E.S. Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *J. Virol.* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)]
8. Hutt-Fletcher, L.M. The Long and Complicated Relationship between Epstein-Barr Virus and Epithelial Cells. *J. Virol.* **2017**, *91*. [[CrossRef](#)]
9. Zhang, H.; Li, Y.; Wang, H.-B.; Zhang, A.; Chen, M.-L.; Fang, Z.-X.; Dong, X.-D.; Li, S.-B.; Du, Y.; Xiong, D.; et al. Author Correction: Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1075. [[CrossRef](#)]
10. Hutt-Fletcher, L.M. Epstein-Barr Virus Entry. *J. Virol.* **2007**, *81*, 7825–7832. [[CrossRef](#)]
11. Haan, K.M.; Kwok, W.W.; Longnecker, R.; Speck, P. Epstein-Barr Virus Entry Utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a Coreceptor. *J. Virol.* **2000**, *74*, 2451–2454. [[CrossRef](#)]
12. Nijland, M.; Kersten, M.J.; Pals, S.; Bemelman, F.; ten Berge, I. Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplant. Direct* **2016**, *2*, e48. [[CrossRef](#)]
13. Thorley-Lawson, D.A.; Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1328–1337. [[CrossRef](#)]
14. Thorley-Lawson, D.A. EBV Persistence—Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2015**, *390*, 151–209. [[CrossRef](#)]
15. Xing, L.; Kieff, E. Epstein-Barr Virus BHRF1 Micro- and Stable RNAs during Latency III and after Induction of Replication. *J. Virol.* **2007**, *81*, 9967–9975. [[CrossRef](#)]
16. Babcock, G.J.; Hochberg, D.; Thorley-Lawson, A.D. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* **2000**, *13*, 497–506. [[CrossRef](#)]
17. Babcock, G.J.; Decker, L.L.; Volk, M.; Thorley-Lawson, D.A. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **1998**, *9*, 395–404. [[CrossRef](#)]
18. Hochberg, D.; Middeldorp, J.M.; Catalina, M.; Sullivan, J.L.; Luzuriaga, K.; Thorley-Lawson, D.A. Demonstration of the Burkitt’s lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 239–244. [[CrossRef](#)]
19. Laichalk, L.L.; Thorley-Lawson, D.A. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J. Virol.* **2005**, *79*, 1296–1307. [[CrossRef](#)]

20. Countryman, J.; Miller, G. Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 4085–4089. [[CrossRef](#)]
21. Grogan, E.; Jenson, H.; Countryman, J.; Heston, L.; Gradoville, L.; Miller, G. Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 1332–1336. [[CrossRef](#)]
22. Wen, W.; Iwakiri, D.; Yamamoto, K.; Maruo, S.; Kanda, T.; Takada, K. Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J. Virol.* **2007**, *81*, 1037–1042. [[CrossRef](#)]
23. Chiu, Y.-F.; Sugden, B. Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 359–372. [[CrossRef](#)]
24. Erasing, I.; Nobre, L.; Wang, L.W.; Sodany, L.; Ma, Y.; Paulo, J.A.; Narita, Y.; Ashbaugh, C.W.; Jiang, C.; Grayson, N.E.; et al. A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. *Cell Rep.* **2017**, *19*, 1479–1493. [[CrossRef](#)]
25. Morales-Sánchez, A.; Fuentes-Panana, E. The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis. *Cancers* **2018**, *10*, 98. [[CrossRef](#)]
26. Al Tabaa, Y.; Tuaillon, E.; Bollore, K.; Foulongne, V.; Petitjean, G.; Seigneurin, J.-M.; Duperray, C.; Desgranges, C.; Vendrell, J.-P. Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* **2009**, *113*, 604–611. [[CrossRef](#)]
27. Münz, C. Latency and Lytic Replication in Epstein-Barr Virus-Associated Oncogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*. [[CrossRef](#)]
28. Shannon-Lowe, C.; Rickinson, A.B.; Bell, A.I. Epstein-Barr virus-associated lymphomas. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2017**, *372*. [[CrossRef](#)]
29. Yin, H.; Qu, J.; Peng, Q.; Gan, R. Molecular mechanisms of EBV-driven cell cycle progression and oncogenesis. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* **2019**, *208*, 573–583. [[CrossRef](#)]
30. Raab-Traub, N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. *Curr. Opin. Virol.* **2012**, *2*, 453–458. [[CrossRef](#)]
31. Jha, H.C.; Pei, Y.; Robertson, E.S. Epstein-Barr Virus: Diseases Linked to Infection and Transformation. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*. [[CrossRef](#)]
32. El-Sharkawy, A.; Al Zaidan, L.; Malki, A. Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Front. Oncol.* **2018**, *8*, 265. [[CrossRef](#)]
33. Zhou, Y.; Attygalle, A.D.; Chuang, S.-S.; Diss, T.; Ye, H.; Liu, H.; Hamoudi, R.A.; Munson, P.; Bacon, C.M.; Dogan, A.; et al. Angioimmunoblastic T-cell lymphoma: Histological progression associates with EBV and HHV6B viral load. *Br. J. Haematol.* **2007**, *138*, 44–53. [[CrossRef](#)]
34. Drouet, E. The Role of the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle in Tumor Progression: Consequences in Diagnosis and Therapy. In *Human Herpesvirus Infection—Biological Features, Transmission, Symptoms, Diagnosis and Treatment*; Luis Thomasini, R., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2020; ISBN 978-1-83881-158-7.
35. Ma, S.-D.; Yu, X.; Mertz, J.E.; Gumperz, J.E.; Reinheim, E.; Zhou, Y.; Tang, W.; Burlingham, W.J.; Gulley, M.L.; Kenney, S.C. An Epstein-Barr Virus (EBV) Mutant with Enhanced BZLF1 Expression Causes Lymphomas with Abortive Lytic EBV Infection in a Humanized Mouse Model. *J. Virol.* **2012**, *86*, 7976–7987. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rothe, R.; Liguori, L.; Villegas-Mendez, A.; Marques, B.; Grunwald, D.; Drouet, E.; Lenormand, J.L. Characterization of the cell-penetrating properties of the Epstein-Barr virus ZEBRA trans-activator. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 20224–20233. [[CrossRef](#)]
37. Hong, S.; Wang, D.; Horton, J.R.; Zhang, X.; Speck, S.H.; Blumenthal, R.M.; Cheng, X. Methyl-dependent and spatial-specific DNA recognition by the orthologous transcription factors human AP-1 and Epstein-Barr virus Zta. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, 2503–2515. [[CrossRef](#)]
38. Heston, L.; El-Guindy, A.; Countryman, J.; Dela Cruz, C.; Delecluse, H.-J.; Miller, G. Amino Acids in the Basic Domain of Epstein-Barr Virus ZEBRA Protein Play Distinct Roles in DNA Binding, Activation of Early Lytic Gene Expression, and Promotion of Viral DNA Replication. *J. Virol.* **2006**, *80*, 9115–9133. [[CrossRef](#)]
39. Petosa, C.; Morand, P.; Baudin, F.; Moulin, M.; Artero, J.B.; Müller, C.W. Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol. Cell* **2006**, *21*, 565–572. [[CrossRef](#)]

40. Chang, Y.N.; Dong, D.L.; Hayward, G.S.; Hayward, S.D. The Epstein-Barr virus Zta transactivator: A member of the bZIP family with unique DNA-binding specificity and a dimerization domain that lacks the characteristic heptad leucine zipper motif. *J. Virol.* **1990**, *64*, 3358–3369. [[CrossRef](#)]
41. El-Guindy, A.S.; Heston, L.; Delecluse, H.-J.; Miller, G. Phosphoacceptor Site S173 in the Regulatory Domain of Epstein-Barr Virus ZEBRA Protein Is Required for Lytic DNA Replication but Not for Activation of Viral Early Genes. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3303–3316. [[CrossRef](#)]
42. Liu, Y.C.; Chen, Z.; Burrows, S.R.; Purcell, A.W.; McCluskeys, J.; Rossjohn, J.; Gras, S. The energetic basis underpinning T-cell receptor recognition of a super-bulged peptide bound to a major histocompatibility complex class I molecule. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 12267–12276. [[CrossRef](#)]
43. Tynan, F.E.; Elhassen, D.; Purcell, A.W.; Burrows, J.M.; Borg, N.A.; Miles, J.J.; Williamson, N.A.; Green, K.J.; Tellam, J.; Kjer-Nielsen, L.; et al. The immunogenicity of a viral cytotoxic T cell epitope is controlled by its MHC-bound conformation. *J. Exp. Med.* **2005**, *202*, 1249–1260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Weber, E.; Buzovetsky, O.; Heston, L.; Yu, K.-P.; Knecht, K.M.; El-Guindy, A.; Miller, G.; Xiong, Y. A Noncanonical Basic Motif of Epstein-Barr Virus ZEBRA Protein Facilitates Recognition of Methylated DNA, High-Affinity DNA Binding, and Lytic Activation. *J. Virol.* **2019**, *93*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Mahot, S.; Fender, P.; Vivès, R.R.; Caron, C.; Perrissin, M.; Gruffat, H.; Sergeant, A.; Drouet, E. Cellular uptake of the EBV transcription factor EB1/Zta. *Virus Res.* **2005**, *110*, 187–193. [[CrossRef](#)]
46. Váňová, J.; Hejtmánková, A.; Kalbáčová, M.H.; Španielová, H. The Utilization of Cell-Penetrating Peptides in the Intracellular Delivery of Viral Nanoparticles. *Materials* **2019**, *12*, 2671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Kurnaeva, M.A.; Sheval, E.V.; Musinova, Y.R.; Vassetzky, Y.S. Tat basic domain: A “Swiss army knife” of HIV-1 Tat? *Rev. Med. Virol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
48. Cai, M.; Liao, Z.; Chen, T.; Wang, P.; Zou, X.; Wang, Y.; Xu, Z.; Jiang, S.; Huang, J.; Chen, D.; et al. Characterization of the subcellular localization of Epstein-Barr virus encoded proteins in live cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 70006–70034. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Park, R.; Heston, L.; Shedd, D.; Delecluse, H.J.; Miller, G. Mutations of amino acids in the DNA-recognition domain of Epstein-Barr virus ZEBRA protein alter its sub-nuclear localization and affect formation of replication compartments. *Virology* **2008**, *382*, 145–162. [[CrossRef](#)]
50. Mikaelian, I.; Drouet, E.; Marechal, V.; Denoyel, G.; Nicolas, J.C.; Sergeant, A. The DNA-binding domain of two bZIP transcription factors, the Epstein-Barr virus switch gene product EB1 and Jun, is a bipartite nuclear targeting sequence. *J. Virol.* **1993**, *67*, 734–742. [[CrossRef](#)]
51. Ramasubramanian, S.; Osborn, K.; Al-Mohammad, R.; Naranjo Perez-Fernandez, I.B.; Zuo, J.; Balan, N.; Godfrey, A.; Patel, H.; Peters, G.; Rowe, M.; et al. Epstein-Barr virus transcription factor Zta acts through distal regulatory elements to directly control cellular gene expression. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, 3563–3577. [[CrossRef](#)]
52. El-Guindy, A.S.; So, Y.P.; Countryman, J.; Miller, G. Identification of constitutive phosphorylation sites on the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 3085–3095. [[CrossRef](#)]
53. Kolman, J.L.; Taylor, N.; Marshak, D.R.; Miller, G. Serine-173 of the Epstein-Barr virus ZEBRA protein is required for DNA binding and is a target for casein kinase II phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10115–10119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Koike, T. Phosphate-Affinity Gel Electrophoresis Using a Phos-Tag Molecule for Phosphoproteome Study. *Curr. Proteom.* **2012**, *6*, 104–121. [[CrossRef](#)]
55. Traylen, C.; Ramasubramanian, S.; Zuo, J.; Rowe, M.; Almohammad, R.; Heesom, K.; Sweet, S.M.M.; Matthews, D.A.; Sinclair, A.J. Identification of Epstein-Barr virus replication proteins in Burkitt’s lymphoma cells. *Pathogens* **2015**, *4*, 739–751. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Adamson, A.L. Effects of SUMO-1 upon Epstein-Barr virus BZLF1 function and BMRF1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *336*, 22–28. [[CrossRef](#)]
57. Murata, T.; Hotta, N.; Toyama, S.; Nakayama, S.; Chiba, S.; Isomura, H.; Ohshima, T.; Kanda, T.; Tsurumi, T. Transcriptional repression by sumoylation of Epstein-Barr virus BZLF1 protein correlates with association of histone deacetylase. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 23925–23935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Adamson, A.L.; Kenney, S. Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BZLF1 Is SUMO-1 Modified and Disrupts Promyelocytic Leukemia Bodies. *J. Virol.* **2001**, *75*, 2388–2399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

59. Hagemeyer, S.R.; Dickerson, S.J.; Meng, Q.; Yu, X.; Mertz, J.E.; Kenney, S.C. Sumoylation of the Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein Inhibits Its Transcriptional Activity and Is Regulated by the Virus-Encoded Protein Kinase. *J. Virol.* **2010**, *84*, 4383–4394. [[CrossRef](#)]
60. Flower, K.; Thomas, D.; Heather, J.; Ramasubramanyan, S.; Jones, S. Epigenetic Control of Viral Life-Cycle by a DNA-Methylation Dependent Transcription Factor. *PLoS ONE* **2011**, *6*, 25922. [[CrossRef](#)]
61. Dickerson, S.J.; Xing, Y.; Robinson, A.R.; Seaman, W.T.; Gruffat, H.; Kenney, S.C. Methylation-dependent binding of the Epstein-Barr virus BZLF1 protein to viral promoters. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*. [[CrossRef](#)]
62. Bienert, S.; Waterhouse, A.; de Beer, T.; Tauriello, G.; Studer, G.; Bordoli, L.; Schwede, T. The SWISS-MODEL Repository: New features and functionalities. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, D313–D319. [[CrossRef](#)]
63. Lieberman, P.M.; Berk, A.J. The Zta trans-activator protein stabilizes TFIID association with promoter DNA by direct protein-protein interaction. *Genes Dev.* **1991**, *5*, 2441–2454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Lieberman, P.M.; Ozer, J.; Gürsel, D.B. Requirement for transcription factor IIA (TFIIA)-TFIID recruitment by an activator depends on promoter structure and template competition. *Mol. Cell. Biol.* **1997**, *17*, 6624–6632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chen, C.J.; Deng, Z.; Kim, A.Y.; Blobel, G.A.; Lieberman, P.M. Stimulation of CREB binding protein nucleosomal histone acetyltransferase activity by a class of transcriptional activators. *Mol. Cell. Biol.* **2001**, *21*, 476–487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Murata, T.; Sato, Y.; Nakayama, S.; Kudoh, A.; Iwahori, S.; Isomura, H.; Tajima, M.; Hishiki, T.; Ohshima, T.; Hijikata, M.; et al. TORC2, a Coactivator of cAMP-response Element-binding Protein, Promotes Epstein-Barr Virus Reactivation from Latency through Interaction with Viral BZLF1 Protein. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 8033–8041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Balan, N.; Osborn, K.; Sinclair, A.J. Repression of CIITA by the Epstein-Barr virus transcription factor Zta is independent of its dimerization and DNA binding. *J. Gen. Virol.* **2016**, *97*, 725–732. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Bristol, J.A.; Robinson, A.R.; Barlow, E.A.; Kenney, S.C. The Epstein-Barr Virus BZLF1 Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Expression through Effects on Cellular C/EBP Proteins. *J. Virol.* **2010**, *84*, 12362–12374. [[CrossRef](#)]
69. Dreyfus, D.H.; Nagasawa, M.; Kelleher, C.A.; Gelfand, E.W. Stable expression of Epstein-Barr virus BZLF1-encoded ZEBRA protein activates p53-dependent transcription in human Jurkat T-lymphoblastoid cells. *Blood* **2000**, *96*, 625–634. [[CrossRef](#)]
70. Sato, Y.; Shirata, N.; Kudoh, A.; Iwahori, S.; Nakayama, S.; Murata, T.; Isomura, H.; Nishiyama, Y.; Tsurumi, T. Expression of Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early protein induces p53 degradation independent of MDM2, leading to repression of p53-mediated transcription. *Virology* **2009**, *388*, 204–211. [[CrossRef](#)]
71. Morrison, T.E.; Kenney, S.C. BZLF1, an Epstein-Barr virus immediate-early protein, induces p65 nuclear translocation while inhibiting p65 transcriptional function. *Virology* **2004**, *328*, 219–232. [[CrossRef](#)]
72. Raver, R.M.; Panfil, A.R.; Hagemeyer, S.R.; Kenney, S.C. The B-Cell-Specific Transcription Factor and Master Regulator Pax5 Promotes Epstein-Barr Virus Latency by Negatively Regulating the Viral Immediate Early Protein BZLF1. *J. Virol.* **2013**, *87*, 8053–8063. [[CrossRef](#)]
73. Robinson, A.R.; Kwek, S.S.; Kenney, S.C. The B-Cell Specific Transcription Factor, Oct-2, Promotes Epstein-Barr Virus Latency by Inhibiting the Viral Immediate-Early Protein, BZLF1. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Zhou, Y.; Heesom, K.; Osborn, K.; AlMohammed, R.; Sweet, S.M.; Sinclair, A.J. Identifying the Cellular Interactome of Epstein-Barr Virus Lytic Regulator Zta Reveals Cellular Targets Contributing to Viral Replication. *J. Virol.* **2020**, *94*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Hahn, A.M.; Huye, L.E.; Ning, S.; Webster-Cyriaque, J.; Pagano, J.S. Interferon regulatory factor 7 is negatively regulated by the Epstein-Barr virus immediate-early gene, BZLF-1. *J. Virol.* **2005**, *79*, 10040–10052. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Gao, Z.; Krithivas, A.; Finan, J.E.; Semmes, O.J.; Zhou, S.; Wang, Y.; Hayward, S.D. The Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta interacts with the helicase-primase replication proteins. *J. Virol.* **1998**, *72*, 8559–8567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Rennekamp, A.J.; Wang, P.; Lieberman, P.M. Evidence for DNA Hairpin Recognition by Zta at the Epstein-Barr Virus Origin of Lytic Replication. *J. Virol.* **2010**, *84*, 7073–7082. [[CrossRef](#)]

78. Sarisky, R.T.; Gao, Z.; Lieberman, P.M.; Fixman, E.D.; Hayward, G.S.; Hayward, S.D. A replication function associated with the activation domain of the Epstein-Barr virus Zta transactivator. *J. Virol.* **1996**, *70*, 8340–8347. [[CrossRef](#)]
79. Schepers, A.; Pich, D.; Hammerschmidt, W. Activation of oriLyt, the lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus, by BZLF1. *Virology* **1996**, *220*, 367–376. [[CrossRef](#)]
80. Sato, Y.; Kamura, T.; Shirata, N.; Murata, T.; Kudoh, A.; Iwahori, S.; Nakayama, S.; Isomura, H.; Nishiyama, Y.; Tsurumi, T. Degradation of Phosphorylated p53 by Viral Protein-ECS E3 Ligase Complex. *PLOS Pathog.* **2009**, *5*, e1000530. [[CrossRef](#)]
81. Wiedmer, A.; Wang, P.; Zhou, J.; Rennekamp, A.J.; Tiranti, V.; Zeviani, M.; Lieberman, P.M. Epstein-Barr virus immediate-early protein Zta co-opts mitochondrial single-stranded DNA binding protein to promote viral and inhibit mitochondrial DNA replication. *J. Virol.* **2008**, *82*, 4647–4655. [[CrossRef](#)]
82. Bailey, S.G.; Verrall, E.; Schelcher, C.; Rhie, A.; Doherty, A.J.; Sinclair, A.J. Functional interaction between Epstein-Barr virus replication protein Zta and host DNA damage response protein 53BP1. *J. Virol* **2009**, *83*, 11116–11122. [[CrossRef](#)]
83. Schaeffner, M.; Mrozek-Gorska, P.; Buschle, A.; Woellmer, A.; Tagawa, T.; Cernilogar, F.M.; Schotta, G.; Krietenstein, N.; Liele, C.; Korber, P.; et al. BZLF1 interacts with chromatin remodelers promoting escape from latent infections with EBV. *Life Sci. Alliance* **2019**, *2*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Montone, K.T.; Hodinka, R.L.; Salhany, K.E.; Lavi, E.; Rostami, A.; Tomaszewski, J.E. Identification of Epstein-Barr virus lytic activity in post-transplantation lymphoproliferative disease. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* **1996**, *9*, 621–630.
85. Hong, G.K.; Gulley, M.L.; Feng, W.-H.; Delecluse, H.-J.; Holley-Guthrie, E.; Kenney, S.C. Epstein-Barr virus lytic infection contributes to lymphoproliferative disease in a SCID mouse model. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13993–14003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Ma, S.-D.; Hegde, S.; Young, K.H.; Sullivan, R.; Rajesh, D.; Zhou, Y.; Jankowska-Gan, E.; Burlingham, W.J.; Sun, X.; Gulley, M.L.; et al. A New Model of Epstein-Barr Virus Infection Reveals an Important Role for Early Lytic Viral Protein Expression in the Development of Lymphomas. *J. Virol.* **2011**, *85*, 165–177. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Habib, M.; Buisson, M.; Lupo, J.; Agbalika, F.; Socié, G.; Germe, R.; Baccard, M.; Imbert-Marcille, B.-M.; Dantal, J.; Morand, P.; et al. Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTL. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 10479. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Brousset, P.; Knecht, H.; Rubin, B.; Drouet, E.; Chittal, S.; Meggetto, F.; Saati, T.A.; Bachmann, E.; Denoyel, G.; Sergeant, A. Demonstration of Epstein-Barr virus replication in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *Blood* **1993**, *82*, 872–876. [[CrossRef](#)]
89. Cohen, M.; Vistarop, A.G.; Huaman, F.; Narbaitz, M.; Metrebian, F.; De Matteo, E.; Preciado, M.V.; Chabay, P.A. Epstein-Barr virus lytic cycle involvement in diffuse large B cell lymphoma. *Hematol. Oncol.* **2018**, *36*, 98–103. [[CrossRef](#)]
90. Xue, S.; Labrecque, L.G.; Lu, Q.-L.; Ong, S.K.; Lampert, I.A.; Kazembe, P.; Molyneux, E.; Broadhead, R.L.; Borgstein, E.; Griffin, B.E. Promiscuous expression of Epstein-Barr virus genes in Burkitt's lymphoma from the central African country Malawi. *Int. J. Cancer* **2002**, *99*, 635–643. [[CrossRef](#)]
91. Xue, S.A.; Lu, Q.L.; Poulson, R.; Karran, L.; Jones, M.D.; Griffin, B.E. Expression of two related viral early genes in Epstein-Barr virus-associated tumors. *J. Virol.* **2000**, *74*, 2793–2803. [[CrossRef](#)]
92. Altmann, M.; Hammerschmidt, W. Epstein-Barr virus provides a new paradigm: A requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol.* **2005**, *3*, e404. [[CrossRef](#)]
93. Accardi, R.; Gruffat, H.; Sirand, C.; Fusil, F.; Gheit, T.; Hernandez-Vargas, H.; Le Calvez-Kelm, F.; Traverse-Glehen, A.; Cosset, F.L.; Manet, E.; et al. The mycotoxin aflatoxin B1 stimulates Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in in vitro and in vivo experimental models. *Carcinogenesis* **2015**, *36*, 1440–1451. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Chêne, A.; Donati, D.; Guerreiro-Cacais, A.O.; Levitsky, V.; Chen, Q.; Falk, K.I.; Orem, J.; Kironde, F.; Wahlgren, M.; Bejarano, M.T. A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 0826–0834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Mannucci, S.; Luzzi, A.; Carugi, A.; Gozzetti, A.; Lazzi, S.; Malagnino, V.; Simmonds, M.; Cusi, M.G.; Leoncini, L.; Van Den Bosch, C.A.; et al. EBV reactivation and chromosomal polysomies: Euphorbia tirucalli as a possible cofactor in endemic Burkitt lymphoma. *Adv. Hematol.* **2012**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

96. Martel-Renoir, D.; Grunewald, V.; Touitou, R.; Schwaab, G.; Joab, I. Qualitative analysis of the expression of Epstein-Barr virus lytic genes in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *J. Gen. Virol.* **1995**, *76*, 1401–1408. [\[CrossRef\]](#)
97. Ramayanti, O.; Juwana, H.; Verkuijlen, S.A.M.W.; Adham, M.; Pegtel, M.D.; Greijer, A.E.; Middeldorp, J.M. Epstein-Barr virus mRNA profiles and viral DNA methylation status in nasopharyngeal brushings from nasopharyngeal carcinoma patients reflect tumor origin. *Int. J. Cancer* **2017**, *140*, 149–162. [\[CrossRef\]](#)
98. Huang, J.; Chen, H.; Hutt-Fletcher, L.; Ambinder, R.F.; Hayward, S.D. Lytic viral replication as a contributor to the detection of Epstein-Barr virus in breast cancer. *J. Virol.* **2003**, *77*, 13267–13274. [\[CrossRef\]](#)
99. Dardari, R.; Menezes, J.; Drouet, E.; Joab, I.; Benider, A.; Bakkali, H.; Kanouni, L.; Jouhadi, H.; Benjaafar, N.; El Gueddari, B.; et al. Analyses of the prognostic significance of the Epstein-Barr virus transactivator ZEBRA protein and diagnostic value of its two synthetic peptides in nasopharyngeal carcinoma. *J. Clin. Virol.* **2008**, *41*, 96–103. [\[CrossRef\]](#)
100. Marrão, G.; Habib, M.; Paiva, A.; Bicout, D.; Fallecker, C.; Franco, S.; Fafi-Kremer, S.; Simões da Silva, T.; Morand, P.; Freire de Oliveira, C.; et al. Epstein-Barr virus infection and clinical outcome in breast cancer patients correlate with immune cell TNF- α /IFN- γ response. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 665. [\[CrossRef\]](#)
101. Zhang, G.; Li, Z.; Zhou, Q. Utility of Serum EB Virus Zta Antibody in the Diagnostic of Nasopharyngeal Carcinoma: Evidences From 2126 Cases and 15,644 Controls. *Front. Oncol.* **2019**, *9*, 1391. [\[CrossRef\]](#)
102. Trumper, P.A.; Epstein, M.A.; Giovanella, B.C.; Finerty, S. Isolation of infectious EB virus from the epithelial tumour cells of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **1977**, *20*, 655–662. [\[CrossRef\]](#)
103. Henle, G.; Henle, W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **1976**, *17*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
104. Chien, Y.C.; Chen, J.Y.; Liu, M.Y.; Yang, H.I.; Hsu, M.M.; Chen, C.J.; Yang, C.S. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *345*, 1877–1882. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
105. Borozan, I.; Zapatka, M.; Frappier, L.; Ferretti, V. Analysis of Epstein-Barr Virus Genomes and Expression Profiles in Gastric Adenocarcinoma. *J. Virol.* **2018**, *92*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
106. Sbih-Lammali, F.; Berger, F.; Busson, P.; Ooka, T. Expression of the DNase encoded by the BGLF5 gene of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma epithelial cells. *Virology* **1996**, *222*, 64–74. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
107. Seto, E.; Yang, L.; Middeldorp, J.; Sheen, T.-S.; Chen, J.-Y.; Fukayama, M.; Eizuru, Y.; Ooka, T.; Takada, K. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J. Med. Virol.* **2005**, *76*, 82–88. [\[CrossRef\]](#)
108. Zur Hausen, A.; Brink, A.A.; Craanen, M.E.; Middeldorp, J.M.; Meijer, C.J.; van den Brule, A.J. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: Expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2745–2748.
109. Tsai, M.-H.; Raykova, A.; Klinke, O.; Bernhardt, K.; Gärtner, K.; Leung, C.S.; Geletneky, K.; Sertel, S.; Münz, C.; Feederle, R.; et al. Spontaneous Lytic Replication and Epitheliotropism Define an Epstein-Barr Virus Strain Found in Carcinomas. *Cell Rep.* **2013**, *5*, 458–470. [\[CrossRef\]](#)
110. Tsai, M.-H.; Lin, X.; Shumilov, A.; Bernhardt, K.; Feederle, R.; Poirey, R.; Kopp-Schneider, A.; Pereira, B.; Almeida, R.; Delecluse, H.-J. The biological properties of different Epstein-Barr virus strains explain their association with various types of cancers. *Oncotarget* **2017**, *8*, 10238–10254. [\[CrossRef\]](#)
111. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [\[CrossRef\]](#)
112. Chatterjee, N.; Walker, G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis: DNA Damage and Repair. *Environ. Mol. Mutagen.* **2017**, *58*, 235–263. [\[CrossRef\]](#)
113. Friedberg, E.C.; Aguilera, A.; Gellert, M.; Hanawalt, P.C.; Hays, J.B.; Lehmann, A.R.; Lindahl, T.; Lowndes, N.; Sarasin, A.; Wood, R.D. DNA repair: From molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* **2006**, *5*, 986–996. [\[CrossRef\]](#)
114. Ciccia, A.; Elledge, S.J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **2010**, *40*, 179–204. [\[CrossRef\]](#)
115. Gargouri, B.; Van Pelt, J.; El Feki, A.E.F.; Attia, H.; Lassoued, S. Induction of Epstein-Barr virus (EBV) lytic cycle in vitro causes oxidative stress in lymphoblastoid B cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* **2009**, *324*, 55–63. [\[CrossRef\]](#)

116. Gargouri, B.; Nasr, R.; ben Mansour, R.; Lassoued, S.; Mseddi, M.; Attia, H.; El Feki, A.e.F.; Van Pelt, J. Reactive Oxygen Species Production and Antioxidant Enzyme Expression after Epstein–Barr Virus Lytic Cycle Induction in Raji Cell Line. *Biol. Trace Elem. Res.* **2011**, *144*, 1449–1457. [[CrossRef](#)]
117. Lassoued, S.; Ben Ameur, R.; Ayadi, W.; Gargouri, B.; Ben Mansour, R.; Attia, H. Epstein-Barr virus induces an oxidative stress during the early stages of infection in B lymphocytes, epithelial, and lymphoblastoid cell lines. *Mol. Cell. Biochem.* **2008**, *313*, 179–186. [[CrossRef](#)]
118. Shumilov, A.; Tsai, M.-H.; Schlosser, Y.T.; Kratz, A.-S.; Bernhardt, K.; Fink, S.; Mizani, T.; Lin, X.; Jauch, A.; Mautner, J.; et al. Epstein-Barr virus particles induce centrosome amplification and chromosomal instability. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14257. [[CrossRef](#)]
119. Lee, C.-P.; Chen, J.-Y.; Wang, J.-T.; Kimura, K.; Takemoto, A.; Lu, C.-C.; Chen, M.-R. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase induces premature chromosome condensation through activation of condensin and topoisomerase II. *J. Virol.* **2007**, *81*, 5166–5180. [[CrossRef](#)]
120. Moquin, S.A.; Thomas, S.; Whalen, S.; Warburton, A.; Fernandez, S.G.; McBride, A.A.; Pollard, K.S.; Miranda, J.L. The Epstein-Barr Virus Episome Maneuvers between Nuclear Chromatin Compartments during Reactivation. *J. Virol.* **2018**, *92*. [[CrossRef](#)]
121. Chang, Y.-H.; Lee, C.-P.; Su, M.-T.; Wang, J.-T.; Chen, J.-Y.; Lin, S.-F.; Tsai, C.-H.; Hsieh, M.-J.; Takada, K.; Chen, M.-R. Epstein-Barr virus BGLF4 kinase retards cellular S-phase progression and induces chromosomal abnormality. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e39217. [[CrossRef](#)]
122. Wu, C.-C.; Liu, M.-T.; Chang, Y.-T.; Fang, C.-Y.; Chou, S.-P.; Liao, H.-W.; Kuo, K.-L.; Hsu, S.-L.; Chen, Y.-R.; Wang, P.-W.; et al. Epstein-Barr virus DNase (BGLF5) induces genomic instability in human epithelial cells. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1932–1949. [[CrossRef](#)]
123. Chiu, S.-H.; Wu, C.-C.; Fang, C.-Y.; Yu, S.-L.; Hsu, H.-Y.; Chow, Y.-H.; Chen, J.-Y. Epstein-Barr virus BALF3 mediates genomic instability and progressive malignancy in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget* **2014**, *5*, 8583–8601. [[CrossRef](#)]
124. Fang, C.-Y.; Lee, C.-H.; Wu, C.-C.; Chang, Y.-T.; Yu, S.-L.; Chou, S.-P.; Huang, P.-T.; Chen, C.-L.; Hou, J.-W.; Chang, Y.; et al. Recurrent chemical reactivations of EBV promotes genome instability and enhances tumor progression of nasopharyngeal carcinoma cells. *Int. J. Cancer* **2009**, *124*, 2016–2025. [[CrossRef](#)]
125. Sall, F.B.; Germini, D.; Shmakova, A.; Diouf, P.M.D.; Wiels, J.; Ndour, M.; Touré, A.O.; Vassetzky, Y. Role of Epstein-Barr Virus Zebra protein in induction of t(8;14) translocation. *Biopolym. Cell* **2019**, *35*, 230–231. [[CrossRef](#)]
126. Hsu, M.; Wu, S.-Y.; Chang, S.-S.; Su, I.-J.; Tsai, C.-H.; Lai, S.-J.; Shiau, A.-L.; Takada, K.; Chang, Y. Epstein-Barr virus lytic transactivator Zta enhances chemotactic activity through induction of interleukin-8 in nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Virol.* **2008**, *82*, 3679–3688. [[CrossRef](#)]
127. Mahot, S.; Sergeant, A.; Drouet, E.; Gruffat, H. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: Induction of transcription of the hIL-10 gene. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 965–974. [[CrossRef](#)]
128. Lee, C.-H.; Yeh, T.-H.; Lai, H.-C.; Wu, S.-Y.; Su, I.-J.; Takada, K.; Chang, Y. Epstein-Barr virus Zta-induced immunomodulators from nasopharyngeal carcinoma cells upregulate interleukin-10 production from monocytes. *J. Virol.* **2011**, *85*, 7333–7342. [[CrossRef](#)]
129. Sheikhpour, E.; Noorbakhsh, P.; Foroughi, E.; Farahnak, S.; Nasiri, R.; Neamatzadeh, H. A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Rep. Biochem. Mol. Biol.* **2018**, *7*, 30–37.
130. Jochum, S.; Moosmann, A.; Lang, S.; Hammerschmidt, W.; Zeidler, R. The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002704. [[CrossRef](#)]
131. Jones, R.J.; Seaman, W.T.; Feng, W.-H.; Barlow, E.; Dickerson, S.; Delecluse, H.-J.; Kenney, S.C. Roles of lytic viral infection and IL-6 in early versus late passage lymphoblastoid cell lines and EBV-associated lymphoproliferative disease. *Int. J. Cancer* **2007**, *121*, 1274–1281. [[CrossRef](#)]
132. Katsumura, K.R.; Maruo, S.; Takada, K. EBV lytic infection enhances transformation of B-lymphocytes infected with EBV in the presence of T-lymphocytes. *J. Med. Virol.* **2012**, *84*, 504–510. [[CrossRef](#)]
133. Tsai, S.-C.; Lin, S.-J.; Chen, P.-W.; Luo, W.-Y.; Yeh, T.-H.; Wang, H.-W.; Chen, C.-J.; Tsai, C.-H. EBV Zta protein induces the expression of interleukin-13, promoting the proliferation of EBV-infected B cells and lymphoblastoid cell lines. *Blood* **2009**, *114*, 109–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

134. Cayrol, C.; Flemington, E.K. Identification of cellular target genes of the Epstein-Barr virus transactivator Zta: Activation of transforming growth factor beta igh3 (TGF-beta igh3) and TGF-beta 1. *J. Virol.* **1995**, *69*, 4206–4212. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
135. Hong, G.K.; Kumar, P.; Wang, L.; Damania, B.; Gulley, M.L.; Delecluse, H.-J.; Polverini, P.J.; Kenney, S.C. Epstein-Barr virus lytic infection is required for efficient production of the angiogenesis factor vascular endothelial growth factor in lymphoblastoid cell lines. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13984–13992. [[CrossRef](#)][[PubMed](#)]
136. Ariza, M.-E.; Glaser, R.; Kaumaya, P.T.P.; Jones, C.; Williams, M.V. The EBV-encoded dUTPase activates NF-kappa B through the TLR2 and MyD88-dependent signaling pathway. *J. Immunol. Baltim. Md. 1950* **2009**, *182*, 851–859. [[CrossRef](#)]
137. Waldman, W.J.; Williams, M.V.; Lemeshow, S.; Binkley, P.; Guttridge, D.; Kiecolt-Glaser, J.K.; Knight, D.A.; Ladner, K.J.; Glaser, R. Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: Evidence for depression-induced atherosclerotic risk. *Brain Behav. Immun.* **2008**, *22*, 215–223. [[CrossRef](#)]
138. Zeidler, R.; Eissner, G.; Meissner, P.; Uebel, S.; Tampé, R.; Lazis, S.; Hammerschmidt, W. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* **1997**, *90*, 2390–2397. [[CrossRef](#)]
139. Swaminathan, S.; Hesselton, R.; Sullivan, J.; Kieff, E. Epstein-Barr virus recombinants with specifically mutated BCRF1 genes. *J. Virol.* **1993**, *67*, 7406–7413. [[CrossRef](#)]
140. Morrison, T.E.; Mauser, A.; Wong, A.; Ting, J.P.; Kenney, S.C. Inhibition of IFN-gamma signaling by an Epstein-Barr virus immediate-early protein. *Immunity* **2001**, *15*, 787–799. [[CrossRef](#)]
141. Li, D.; Qian, L.; Chen, C.; Shi, M.; Yu, M.; Hu, M.; Song, L.; Shen, B.; Guo, N. Down-regulation of MHC class II expression through inhibition of CIITA transcription by lytic transactivator Zta during Epstein-Barr virus reactivation. *J. Immunol.* **2009**, *182*, 1799–1809. [[CrossRef](#)]
142. Zuo, J.; Thomas, W.A.; Haigh, T.A.; Fitzsimmons, L.; Long, H.M.; Hislop, A.D.; Taylor, G.S.; Rowe, M. Epstein-Barr virus evades CD4+ T cell responses in lytic cycle through BZLF1-mediated downregulation of CD74 and the cooperation of vBcl-2. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002455. [[CrossRef](#)]
143. Zuo, J.; Currin, A.; Griffin, B.D.; Shannon-Lowe, C.; Thomas, W.A.; Rensing, M.E.; Wiertz, E.J.H.J.; Rowe, M. The Epstein-Barr virus G-protein-coupled receptor contributes to immune evasion by targeting MHC class I molecules for degradation. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000255. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Zuo, J.; Quinn, L.L.; Tamblyn, J.; Thomas, W.A.; Feederle, R.; Delecluse, H.-J.; Hislop, A.D.; Rowe, M. The Epstein-Barr virus-encoded BILF1 protein modulates immune recognition of endogenously processed antigen by targeting major histocompatibility complex class I molecules trafficking on both the exocytic and endocytic pathways. *J. Virol.* **2011**, *85*, 1604–1614. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Horst, D.; van Leeuwen, D.; Croft, N.P.; Garstka, M.A.; Hislop, A.D.; Kremmer, E.; Rickinson, A.B.; Wiertz, E.J.H.J.; Rensing, M.E. Specific targeting of the EBV lytic phase protein BNLF2a to the transporter associated with antigen processing results in impairment of HLA class I-restricted antigen presentation. *J. Immunol. Baltim. Md. 1950* **2009**, *182*, 2313–2324. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
146. Zuo, J.; Thomas, W.; van Leeuwen, D.; Middeldorp, J.M.; Wiertz, E.J.H.J.; Rensing, M.E.; Rowe, M. The DNase of gammaherpesviruses impairs recognition by virus-specific CD8+T cells through an additional host shutoff function. *J. Virol.* **2008**, *82*, 2385–2393. [[CrossRef](#)]
147. Draborg, A.H.; Duus, K.; Houen, G. Epstein-Barr Virus in Systemic Autoimmune Diseases. *Clin. Dev. Immunol.* **2013**, *2013*, 1–9. [[CrossRef](#)]
148. Haddad, E.; Paczesny, S.; Leblond, V.; Seigneurin, J.M.; Stern, M.; Achkar, A.; Bauwens, M.; Delwail, V.; Debray, D.; Duvoux, C.; et al. Treatment of B-lymphoproliferative disorder with a monoclonal anti-interleukin-6 antibody in 12 patients: A multicenter phase 1-2 clinical trial. *Blood* **2001**, *97*, 1590–1597. [[CrossRef](#)]
149. Masood, R.; Cai, J.; Tulpule, A.; Zheng, T.; Hamilton, A.; Sharma, S.; Espina, B.M.; Smith, D.L.; Gill, P.S. Interleukin 8 is an autocrine growth factor and a surrogate marker for Kaposi's sarcoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **2001**, *7*, 2693–2702.
150. Sall, A.; Caserta, S.; Jolicoeur, P.; Franqueville, L.; de Turenne-Tessier, M.; Ooka, T. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein. *Oncogene* **2004**, *23*, 4938–4944. [[CrossRef](#)]

151. Wiech, T.; Nikolopoulos, E.; Lassman, S.; Heidt, T.; Schöpflin, A.; Sarbia, M.; Werner, M.; Shimizu, Y.; Sakka, E.; Ooka, T.; et al. Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* **2008**, *452*, 621–627. [[CrossRef](#)]
152. Sheng, W.; Decaussin, G.; Sumner, S.; Ooka, T. N-terminal domain of BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus is essential for malignant transformation of rodent fibroblasts and activation of BCL-2. *Oncogene* **2001**, *20*, 1176–1185. [[CrossRef](#)]
153. Wang, Q.; Tsao, S.W.; Ooka, T.; Nicholls, J.M.; Cheung, H.W.; Fu, S.; Wong, Y.C.; Wang, X. Anti-apoptotic role of BARF1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **2006**, *238*, 90–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Morrison, T.E.; Mauser, A.; Klingelhutz, A.; Kenney, S.C. Epstein-Barr virus immediate-early protein BZLF1 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced signaling and apoptosis by downregulating tumor necrosis factor receptor 1. *J. Virol.* **2004**, *78*, 544–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Waugh, D.J.J.; Wilson, C. The Interleukin-8 Pathway in Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2008**, *14*, 6735–6741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Duffy, A.M.; Bouchier-Hayes, D.J.; Harmey, J.H. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Role in Non-Endothelial Cells: Autocrine Signalling by VEGF. In *VEGF and Cancer*; Springer: Boston, MA, USA, 2004; pp. 133–144. ISBN 978-1-4613-4810-8.
157. Yoshizaki, T.; Sato, H.; Murono, S.; Pagano, J.S.; Furukawa, M. Matrix metalloproteinase 9 is induced by the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator. *Clin. Exp. Metastasis* **1999**, *17*, 431–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Lan, Y.-Y.; Yeh, T.-H.; Lin, W.-H.; Wu, S.-Y.; Lai, H.-C.; Chang, F.-H.; Takada, K.; Chang, Y. Epstein-Barr Virus Zta Upregulates Matrix Metalloproteinases 3 and 9 That Synergistically Promote Cell Invasion In Vitro. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Jiang, R.; Cabras, G.; Sheng, W.; Zeng, Y.; Ooka, T. Synergism of BARF1 with Ras Induces Malignant Transformation in Primary Primate Epithelial Cells and Human Nasopharyngeal Epithelial Cells. *Neoplasia* **2009**, *11*, 964–973. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Sista, N.D.; Barry, C.; Sampson, K.; Pagano, J. Physical and functional interaction of the Epstein-Barr virus BZLF1 transactivator with the retinoic acid receptors RAR alpha and RXR alpha. *Nucleic Acids Res.* **1995**, *23*, 1729–1736. [[CrossRef](#)]
161. Wu, F.Y.; Chen, H.; Wang, S.E.; apRhys, C.M.J.; Liao, G.; Fujimuro, M.; Farrell, C.J.; Huang, J.; Hayward, S.D.; Hayward, G.S. CCAAT/Enhancer Binding Protein Interacts with ZTA and Mediates ZTA-Induced p21CIP-1 Accumulation and G1 Cell Cycle Arrest during the Epstein-Barr Virus Lytic Cycle. *J. Virol.* **2003**, *77*, 1481–1500. [[CrossRef](#)]
162. Zerby, D.; Chen, C.J.; Poon, E.; Lee, D.; Shiekhhattar, R.; Lieberman, P.M. The amino-terminal C/H1 domain of CREB binding protein mediates zta transcriptional activation of latent Epstein-Barr virus. *Mol. Cell Biol.* **1999**, *19*, 1617–1626. [[CrossRef](#)]
163. Zhang, Q.; Gutsch, D.; Kenney, S. Functional and physical interaction between p53 and BZLF1: Implications for Epstein-Barr virus latency. *Mol. Cell Biol.* **1994**, *14*, 1929–1938. [[CrossRef](#)]
164. Cayrol, C.; Flemington, E.K. The Epstein-Barr virus bZIP transcription factor Zta causes G0/G1 cell cycle arrest through induction of cyclin-dependent kinase inhibitors. *EMBO J.* **1996**, *15*, 2748–2759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Mauser, A.; Saito, S.; Appella, E.; Anderson, C.W.; Seaman, W.T.; Kenney, S. The Epstein-Barr Virus Immediate-Early Protein BZLF1 Regulates p53 Function through Multiple Mechanisms. *J. Virol.* **2002**, *76*, 12503–12512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
166. Germini, D.; Tsfasman, T.; Klibi, M.; El-Amine, R.; Pichugin, A.; Iarovaia, O.V.; Bilhou-Nabera, C.; Subra, F.; Bou Saada, Y.; Sukhanova, A.; et al. HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia* **2017**, *31*, 2515–2522. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Sall, F.B.; El Amine, R.; Markozashvili, D.; Tsfasman, T.; Oksenhendler, E.; Lipinski, M.; Vassetzky, Y.; Germini, D. HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B-lymphocytes from peripheral blood. *J. Cell. Physiol.* **2019**. [[CrossRef](#)]
168. El-Amine, R.; Germini, D.; Zakharova, V.V.; Tsfasman, T.; Sheval, E.V.; Louzada, R.A.N.; Dupuy, C.; Bilhou-Nabera, C.; Hamade, A.; Najjar, F.; et al. HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biol.* **2018**, *15*, 97–108. [[CrossRef](#)]

169. Drouet, E.; Brousset, P.; Fares, F.; Icart, J.; Verniol, C.; Meggetto, F.; Schlaifer, D.; Desmorat-Coat, H.; Rigal-Huguet, F.; Niveleau, A.; et al. High Epstein-Barr virus serum load and elevated titers of anti-ZEBRA antibodies in patients with EBV-harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *J. Med. Virol.* **1999**, *57*, 383–389. [[CrossRef](#)]
170. Chan, K.H.; Gu, Y.L.; Ng, F.; Ng, P.S.P.; Seto, W.H.; Sham, J.S.T.; Chua, D.; Wei, W.; Chen, Y.L.; Luk, W.; et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **2003**, *105*, 706–709. [[CrossRef](#)]
171. Dardari, R.; Hinderer, W.; Lang, D.; Benider, A.; El Gueddari, B.; Joab, I.; Benslimane, A.; Khyatti, M. Antibody responses to recombinant Epstein-Barr virus antigens in nasopharyngeal carcinoma patients: Complementary test of ZEBRA protein and early antigens p54 and p138. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 3164–3170. [[CrossRef](#)]
172. Joab, I.; Nicolas, J.C.; Schwaab, G.; de-Thé, G.; Clausse, B.; Perricaudet, M.; Zeng, Y. Detection of anti-Epstein-Barr-virus transactivator (ZEBRA) antibodies in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* **1991**, *48*, 647–649. [[CrossRef](#)]
173. Mathew, A.; Cheng, H.M.; Sam, C.K.; Joab, I.; Prasad, U.; Cochet, C. A high incidence of serum IgG antibodies to the Epstein-Barr virus replication activator protein in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Immunol. Immunother. CII* **1994**, *38*, 68–70. [[CrossRef](#)]
174. Yip, T.T.; Ngan, R.K.; Lau, W.H.; Poon, Y.F.; Joab, I.; Cochet, C.; Cheng, A.K. A possible prognostic role of immunoglobulin-G antibody against recombinant Epstein-Barr virus BZLF-1 transactivator protein ZEBRA in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* **1994**, *74*, 2414–2424. [[CrossRef](#)]
175. Drouet, E.B.; Chapuis-Cellier, C.; Garnier, J.L.; Touraine, J.L. Early detection of EBV infection and meaning in transplant patients. In *Cancer in Transplantation: Prevention and Treatment*; Touraine, J.L., Traeger, J., Bétuel, H., Dubernard, J.M., Revillard, J.P., Dupuy, C., Eds.; Springer: Dordrecht, The Netherlands, 1996; pp. 201–207. ISBN 978-94-010-6563-4.
176. Fink, S.E.K.; Gandhi, M.K.; Nourse, J.P.; Keane, C.; Jones, K.; Crooks, P.; Jöhrens, K.; Korfel, A.; Schmidt, H.; Neumann, S.; et al. A comprehensive analysis of the cellular and EBV-specific microRNAome in primary CNS PTLD identifies different patterns among EBV-associated tumors. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* **2014**, *14*, 2577–2587. [[CrossRef](#)]
177. Rea, D.; Fourcade, C.; Leblond, V.; Rowe, M.; Joab, I.; Edelman, L.; Bitker, M.O.; Gandjbakhch, I.; Suberbielle, C.; Farcet, J.P. Patterns of Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in Epstein-Barr virus B cell lymphoproliferative disorders after organ transplantation. *Transplantation* **1994**, *58*, 317–324. [[CrossRef](#)]
178. Vajro, P.; Lucariello, S.; Migliaro, F.; Sokal, E.; Gridelli, B.; Vegnente, A.; Iorio, R.; Smets, F.; Quinto, I.; Scala, G. Predictive value of Epstein-Barr virus genome copy number and BZLF1 expression in blood lymphocytes of transplant recipients at risk for lymphoproliferative disease. *J. Infect. Dis.* **2000**, *181*, 2050–2054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Imbert-Marcille, B.M.; Coste-Burel, M.; Robillard, N.; Foucaud-Gamen, J.; Billaudel, S.; Drouet, E. Sequential use of paraformaldehyde and methanol as optimal conditions for the direct quantification of ZEBRA and rta antigens by flow cytometry. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **2000**, *7*, 206–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
180. Babcock, G.J.; Decker, L.L.; Freeman, R.B.; Thorley-Lawson, D.A. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J. Exp. Med.* **1999**, *190*, 567–576. [[CrossRef](#)]
181. Miyashita, E.M.; Yang, B.; Lam, K.M.; Crawford, D.H.; Thorley-Lawson, D.A. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell* **1995**, *80*, 593–601. [[CrossRef](#)]
182. Feng, W.; Westphal, E.; Mauser, A.; Raab-Traub, N.; Gulley, M.L.; Busson, P.; Kenney, S.C. Use of adenovirus vectors expressing Epstein-Barr virus (EBV) immediate-early protein BZLF1 or BRLF1 to treat EBV-positive tumors. *J. Virol.* **2002**, *76*, 10951–10959. [[CrossRef](#)]
183. Bilger, A.; Plowshay, J.; Ma, S.; Nawandar, D.; Barlow, E.A.; Romero-Masters, J.C.; Bristol, J.A.; Li, Z.; Tsai, M.-H.; Delecluse, H.-J.; et al. Leflunomide/teriflunomide inhibit Epstein-Barr virus (EBV)-induced lymphoproliferative disease and lytic viral replication. *Oncotarget* **2017**, *8*, 44266–44280. [[CrossRef](#)]
184. Kawada, J.-I.; Ando, S.; Torii, Y.; Watanabe, T.; Sato, Y.; Ito, Y.; Kimura, H. Antitumor effects of duvelisib on Epstein-Barr virus-associated lymphoma cells. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1275–1284. [[CrossRef](#)]
185. Daskalogianni, C.; Pyndiah, S.; Apcher, S.; Mazars, A.; Manoury, B.; Ammari, N.; Nylander, K.; Voisset, C.; Blondel, M.; Fähræus, R. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 and ZEBRA: Targets for therapeutic strategies against EBV-carrying cancers. *J. Pathol.* **2015**, *235*, 334–341. [[CrossRef](#)]

186. Hartlage, A.S.; Liu, T.; Patton, J.T.; Garman, S.L.; Zhang, X.; Kurt, H.; Lozanski, G.; Lustberg, M.E.; Caligiuri, M.A.; Baiocchi, R.A. The Epstein-Barr Virus Lytic Protein BZLF1 as a Candidate Target Antigen for Vaccine Development. *Cancer Immunol. Res.* **2015**, *3*, 787–794. [[CrossRef](#)]
187. Kenney, S.C.; Mertz, J.E. Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* **2014**, *26*, 60–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Needham, J.; Adamson, A.L. BZLF1 transcript variants in Epstein-Barr virus-positive epithelial cell lines. *Virus Genes* **2019**, *55*, 779–785. [[CrossRef](#)]
189. Bristol, J.A.; Djavadian, R.; Albright, E.R.; Coleman, C.B.; Ohashi, M.; Hayes, M.; Romero-Masters, J.C.; Barlow, E.A.; Farrell, P.J.; Rochford, R.; et al. A cancer-associated Epstein-Barr virus BZLF1 promoter variant enhances lytic infection. *PLOS Pathog.* **2018**, *14*, e1007179. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

En résumé, nous avons vu dans ce chapitre que le virus EBV infecte près de 90% de la population mondiale avec une répartition géographique variable des souches virales. Le virus cible majoritairement les lymphocytes B et y persiste à vie sous forme latente, se réactivant sous certaines conditions, définissant le cycle lytique. Ce dernier peut être productif aboutissant à la lyse de la cellule infectée et à la production de nouveaux virions ; ou abortif sans lyse de la cellule. Chacune de ces phases (latence et cycle lytique) est caractérisée par un profil d'expression particulier de protéines virales. Le virus EBV est associé à une grande variété de pathologies malignes. Aussi bien les protéines de latence que les protéines du cycle lytique (via le cycle abortif) contribuent à l'oncogénicité du virus EBV. Certaines protéines comme EBNA1, EBNA3C ou Zebra sont associées à une instabilité génomique mais au terme de ce chapitre, nous n'avons pas trouvé de données montrant une implication directe du virus EBV dans les mécanismes de formation de la translocation t(8 ;14) du LB.

4. Virus de l'Immunodéficience Humaine

Dans ce chapitre, nous allons aborder le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), essentiellement le type 1. Nous ferons d'abord un bref rappel sur la définition et la taxonomie du VIH, puis nous parlerons des propriétés du VIH-1 notamment sa structure, ses modes de contamination, ses cellules cibles et son cycle de vie dans l'organisme. La troisième sous partie sera consacrée à la protéine Tat, puis nous verrons les pathologies associées au VIH avant de terminer par les mécanismes d'oncogenèse du VIH-1

4.1. Définition et classification	114
4.2. Propriétés du VIH-1	114
4.2.1. Structure	114
4.2.1.1. Structure générale	114
4.2.1.2. Génome viral et produits des gènes viraux	115
4.2.2. Cycle biologique	116
4.2.2.1. Contamination	116
4.2.2.2. Cellules cibles	116
4.2.2.3. Cycle de vie dans l'organisme	117
4.3. La protéine Tat	119
4.3.1. Structure et organisation fonctionnelle	119
4.3.2. Localisation	119
4.3.3. Effets biologiques	120
4.3.3.1. Tat intracellulaire	120
4.3.3.2. Tat extracellulaire	121
4.4. Pathologies associées au VIH-1	122
4.5. Oncogenèse liée au VIH-1	123

4.1. Définition et classification

Le VIH est un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive appartenant à la famille des *Retroviridae* dont les membres sont communément appelés rétrovirus. Les virus de cette famille ont la particularité de posséder une enzyme, une ADN-polymérase ARN-dépendante encore appelée transcriptase inverse (TI) ou rétrotranscriptase (RT). La TI permet de transcrire l'ARN des rétrovirus en ADN capable de s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Le VIH appartient à la sous famille des *Orthoretrovirinae* et au genre *Lentivirus*. Il existe deux types de VIH : VIH-1 et VIH-2 qui diffèrent principalement sur le plan génétique avec globalement 42% d'homologie (Peeters et al., 2014). Les VIH sont les agents responsables du Syndrome d'Immunodéficience Acquise (SIDA). En 2019, ONUSIDA estimait à environs 38 millions le nombre de personnes infectées par le VIH avec une incidence annuelle de 1.7 millions nouveaux cas et 690.000 personnes décédées de maladies liées au SIDA dans le monde (ONUSIDA 2020). Dans ce chapitre nous verrons essentiellement le VIH-1 qui est la plus répandue.

4.2. Propriétés du VIH-1

4.2.1. Structure

4.2.1.1. Structure générale

Le VIH-1 est un virus sphérique de 150 nm de diamètre environ. Il est composé de l'extérieur vers l'intérieur : i) d'une enveloppe membranaire – composée d'une bicouche lipidique qui dérive de la membrane de la cellule hôte – et hérissée de spicules glycoprotéiques composées d'une partie interne transmembranaire la gp41 et d'une partie externe, la gp120 ; ii) la matrice, composée de protéines p17, qui tapisse la face interne de l'enveloppe ; iii) la capside en forme de cône tronqué, faite de protéine p24 et qui renferme deux copies de l'ARN viral (ARNv) protégé par la protéine de nucléocapside p7 qui l'entoure. L'ARNv est accompagné de trois enzymes : la TI p66/p51 qui rétro-transcrit l'ARNv viral en ADNv ; l'intégrase p31/32 qui permet l'intégration du génome viral dans celui de la cellule hôte ; et la protéase p10/11 qui intervient dans la phase de maturation des nouveaux virions. (Figure 17)

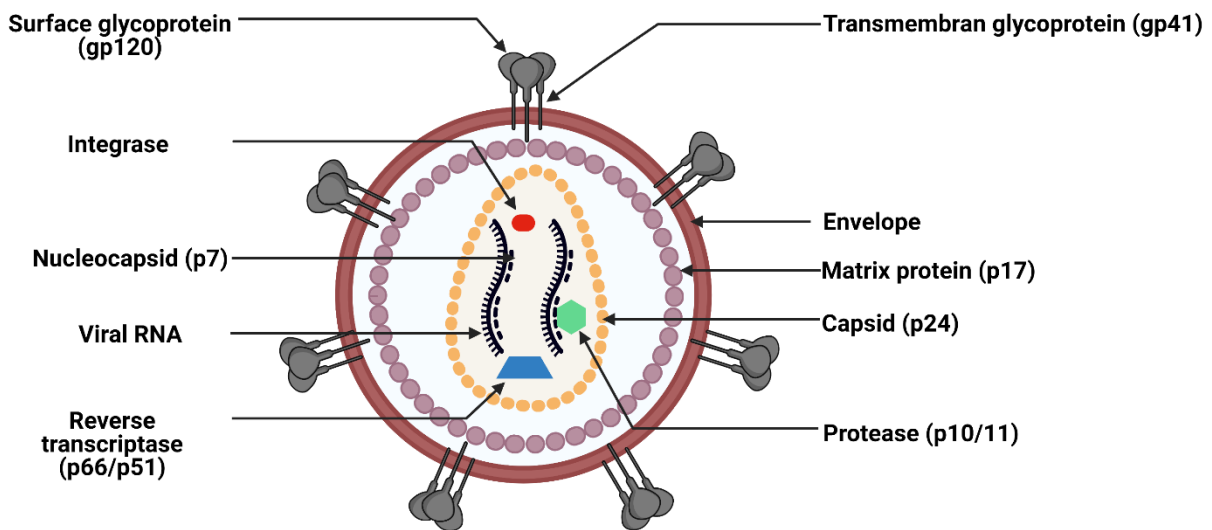


Figure 17: Structure générale du VIH-1

4.2.1.2. Génome viral et produits des gènes viraux

Le VIH-1 est un virus à ARN monocaténaire de polarité positive présent en double copie. L'ARNv, long d'environ 9.7kb, est flanqué de séquences répétées terminales (LTR = *Long Terminal Repeats*) aux extrémités 3' et 5' et possède plusieurs ORF. Il est composé de 9 gènes codant pour 15 protéines (Figure 18).

- ⇒ 3 gènes classiques de structure *gag* qui code pour les protéines de structures capsid, matrice et nucléocapside ; *pol* qui code pour les enzymes transcriptase inverse, intégrase et protéase et *env* qui code pour les glycoprotéines d'enveloppe gp120 et gp41.
- ⇒ 6 gènes de régulations dont
 - o 2 essentiels à la réplication du virus : *tat* qui code pour la protéine Tat, indispensable à la transcription de l'ADN proviral et *rev* qui code pour la protéine Rev nécessaire pour le transfert des ARNm viraux vers le cytoplasme.
 - o 4 accessoires *nef*, *vpr*, *vif* et *vpu* qui n'interviennent pas directement dans la réplication du virus mais qui contribuent fortement à la dissémination du virus dans l'organisme. En effet les protéines codées par ces gènes favorisent l'échappement des cellules infectées au système immunitaire et s'opposent à la réponse cellulaire antivirale.

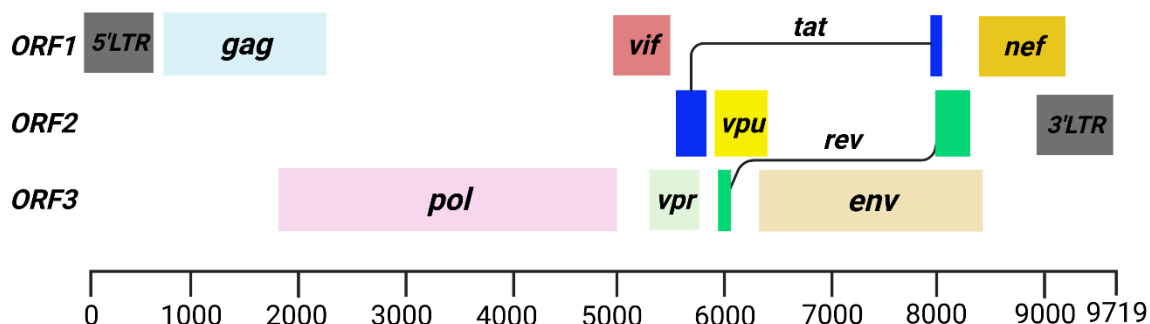


Figure 18: Organisation du génome du VIH-1

Adapté de (Castro-Nallar et al., 2012)

4.2.2. Cycle biologique

4.2.2.1. Contamination

Le VIH se contracte essentiellement par voie sexuelle (homo ou hétérosexuelle), par contact avec du sang infecté ou du matériel contaminé (toxicomanes, tatouages, transfusion sanguine, personnels soignants) ou par transmission verticale (grossesse, accouchement, allaitement). Le VIH a été trouvé dans d'autres fluides biologiques comme la salive, les larmes et l'urine mais des cas de transmission via ces voies n'ont pas été décrits (Moir et al., 2011; Shaw and Hunter, 2012).

4.2.2.2. Cellules cibles

Le VIH-1 cible essentiellement les cellules exprimant le CD4 à leur surface. Il s'agit des lymphocytes T CD4⁺, monocytes, macrophages, cellules dendritiques et les ostéoclastes (Xie et al., 2019). L'expression du CD4 n'est cependant pas suffisante et les cellules doivent en plus exprimer un corécepteur : le CXCR4 (*C-X-C chemokine receptor type 4*) ou le CCR5 (*C-C chemokine receptor type 5*). La possibilité d'infection des cellules B fait encore l'objet de débat. Des études ont montré que l'activation *in vitro* des cellules B naïves par l'IL-4 et /ou le CD40L les rendait susceptibles à une infection par le VIH-1 du fait de l'expression de CD4 et CXCR4 (Gras et al., 1993, 1996; Moir et al., 1999; Poulin et al., 1994). De plus, l'infection et la transformation par le VIH de lignées cellulaires B EBV positives (Casareale et al., 1983; Gras and Dormont, 1991; Laurence and Astrin, 1991; Rodriguez-Alfageme et al., 1998; Tozzi et al., 1989) ou négative (Fritsch et al., 1998; Laurence and Astrin, 1991) a également été décrite. En revanche il y a moins de preuves d'une infection *in vivo* des cellules B par le VIH. Mc Hugh et ses collaborateurs ont récemment rapporté l'infection et la réplication du VIH-1 dans des cellules B de souris humanisés. Cette infection serait facilitée par le virus EBV qui favorise l'expression du CD4 et de

CXCR4 par les cellules B EBV-positives. Cependant, cette co-infection EBV-VIH favorisait leur élimination par les cellules T CD8⁺ comparées aux cellules infectées uniquement par EBV (McHugh et al., 2020). Cette observation semble être exceptionnelle et n'a jamais été décrite chez l'homme. D'autres types cellulaires tels que les cellules épithéliales, les fibrocytes, les astrocytes du système nerveux central ou les cellules souches hématopoïétiques pourraient être de potentiels cibles pour le VIH-1 (Kandathil et al., 2016).

4.2.2.3. Cycle de vie dans l'organisme

Le cycle biologique du VIH-1 (Figure 19), suit globalement celui des virus en général avec quelques particularités notamment la rétrotranscription et l'intégration du génome viral. La fixation ou attachement du virus à la cellule cible se fait par interaction de la gp120 virale avec le récepteur CD4 et un corécepteur CXCR4 ou CCR5 présent à côté du CD4. D'autres types d'internalisation du VIH-1 indépendante des couples CD4/CXCR4 ou CD4/CCR5, ont été rapportés dans les cellules épithéliales rénales (Chen et al., 2011; Hatsukari et al., 2007) ou les astrocytes du système nerveux cérébral (Liu et al., 2004; Russell et al., 2017). La fixation du gp140 sur le corécepteur libère la gp41 qui assure la fusion entre l'enveloppe virale et la membrane cellulaire. Il en résulte une libération de la capside dans le cytoplasme, sa dégradation et la libération de son contenu (ARNv et enzymes). L'ARNv est rétro-transcrit par la TI en ADN double brin appelé ADN proviral qui sera transporté vers le noyau. Cette chronologie ne fait pas encore l'objet de consensus. En effet, des études récentes suggèrent que le transport du génome viral dans le noyau précède la rétrotranscription (Dharan et al., 2020) ou que la décapsidation pourrait avoir lieu dans le noyau (Burdick et al., 2020; Zila et al., 2021). Dans tous les cas, dans le noyau, l'ADN proviral s'intègre au hasard dans le génome de la cellule cible sous l'action de l'intégrase. La machinerie de transcription de la cellule hôte est utilisée pour la transcription de l'ADN proviral. Trois différents types de transcrits sont produits : i) des ARN complètement épissés (2kb) ; des ARN non épissés (9kb) qui servent de génome viral ou pour la production des précurseurs Gag et Gag-Pol ; ou partiellement épissés (4kb) pour les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env. Les ARN complètement épissés sont les premiers à être produits et sont exportés vers le cytoplasme par la machinerie d'export cellulaire pour produire les protéines régulatrices Tat, Rev et Nef qui retournent vers le noyau. Tat est nécessaire pour booster l'activité de la Pol.II et permettre la synthèse des autres transcrit. Le transport des ARN partiellement épissés ou non épissés dépend de la protéine Rev. Dans le cytoplasme, les précurseurs Gag, Gag-Pol ainsi que

les protéines Vif, Vpr, Vpu et Env sont synthétisées. Un mécanisme complexe d'assemblage va aboutir à l'accumulation des protéines et du génome viral et la formation d'une particule virale par bourgeonnement de la membrane plasmique. Ces particules libérées sont immatures et devront subir un processus de maturation avec intervention de la protéase virale pour devenir un virion mature infectieux. Les molécules disponibles pour le traitement antirétroviral ciblent les différentes étapes de la réplication du virus. Dans les cellules à longue durée de vie comme les cellules T mémoires, le provirus peut rester à l'état latent pendant de longues années, échappant ainsi au traitement antirétroviral, mais pouvant se réactiver dans certaines circonstances. Plus détails sur le cycle biologique du VIH-1 sont disponibles dans la revue (Kirchhoff, 2013).

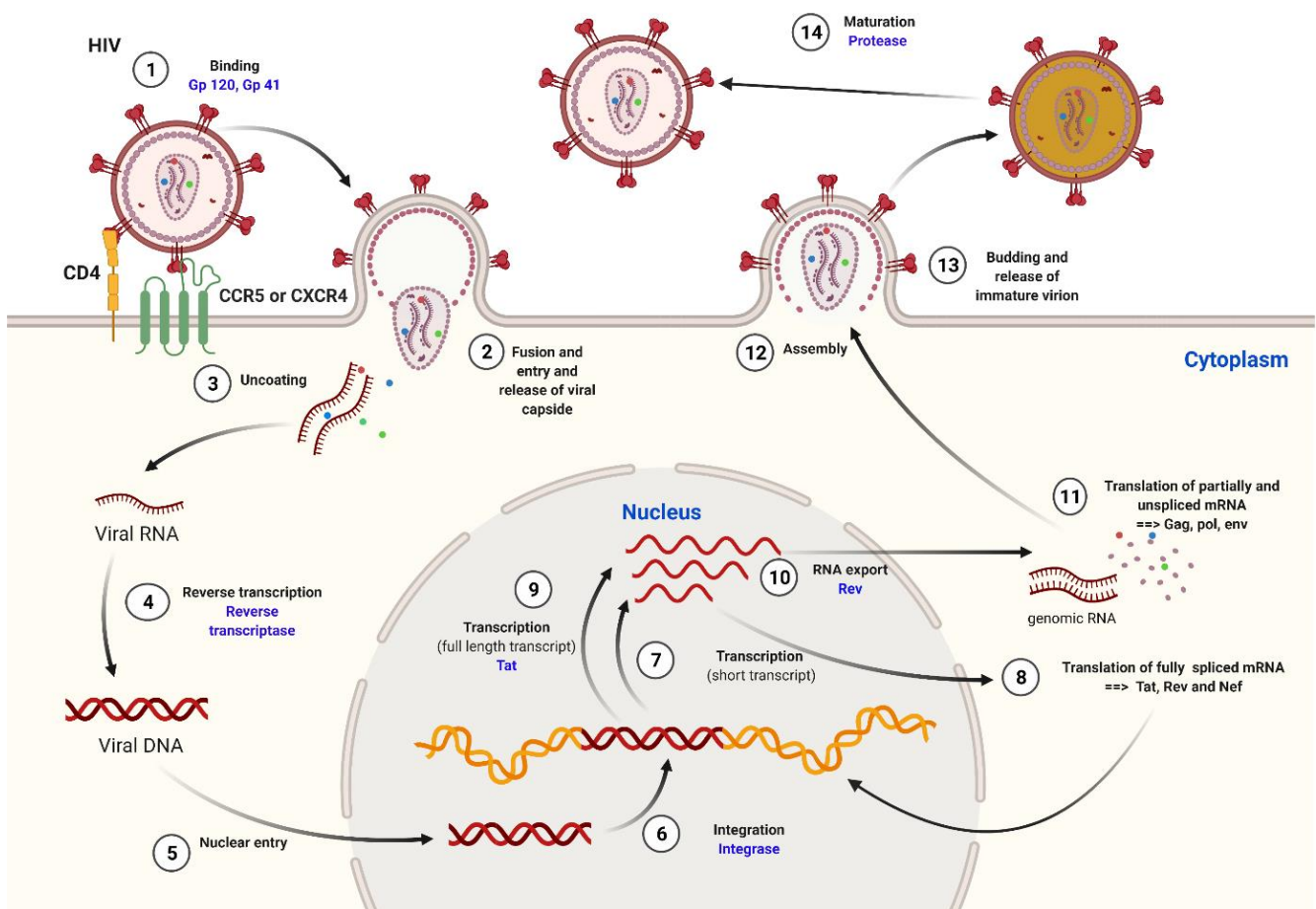


Figure 19: Cycle de vie du VIH-1

4.3. La protéine Tat

4.3.1. Structure et organisation fonctionnelle

Tat est une petite protéine hydrophobe de 86 à 104 acides aminés (aa) avec un poids moléculaire de 14 à 16 kDa. Elle est codée par le gène *tat* du génome viral constitué de deux exons : le premier, hautement conservé code pour les aa 1 à 72 ; le deuxième exon code pour les aa de 73 à 102. La séquence de Tat peut être divisée en quatre domaines fonctionnels (Figure 20) : i) un domaine de transactivation (DTA) important pour les interactions protéine-protéine avec trois sous domaines : une extrémité N-terminale acide riche en proline (1-21 aa), une région riche en cystéine (22-37 aa) et une région centrale hydrophobe (38-48aa) ; ii) un domaine basique riche en arginine (49-58 aa) comprenant le domaine de transduction protéique (PTD = *protein transduction domain*), le signal de localisation nucléaire (NLS = *nuclear localisation signal*) et le domaine de liaison à l'ARN (RBD= *RNA binding domain*) (revue dans (Kurnaeva et al., 2019)) ; iii) un domaine riche en glutamine (59-72 aa) requis pour la liaison de Tat aux séquences TAR (*transactivation responsive region*) et également important pour la fonction apoptotique de Tat ; iv) un domaine C-terminal, seul domaine codé par le deuxième exon et qui contient la séquence d'arginine-glycine-acide aspartique (RGD) (73-86 aa) nécessaire à l'interaction Tat avec les récepteurs de surface cellulaire ; pour revues (Ajasin and Eugenin, 2020; Chiozzini and Toschi, 2016; Clark et al., 2017; Kurnaeva et al., 2019; Viglianti and Mullins, 1988)

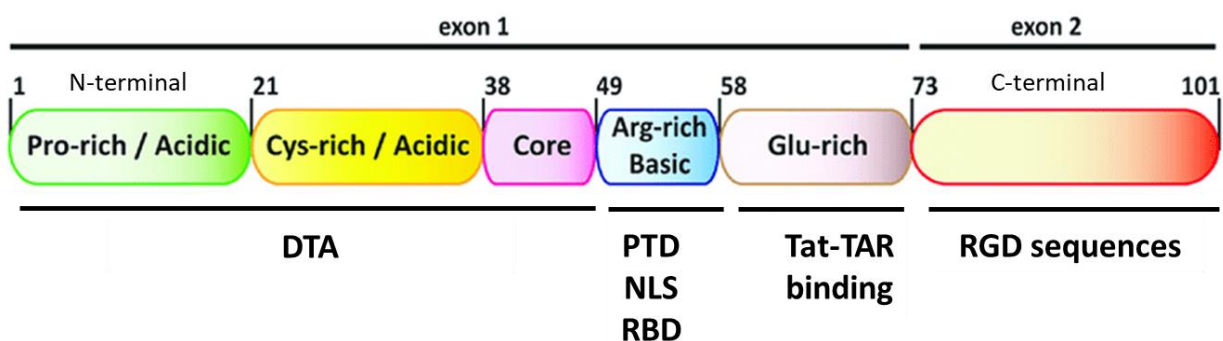


Figure 20: Structure et organisation fonctionnelle de la protéine Tat du VIH-1.

Adapté de (Clark et al., 2017)

4.3.2. Localisation

Tat peut être localisée à l'intérieur des cellules infectées ou pas ; ou dans le milieu extracellulaire. En effet, Tat peut être sécrétée par les cellules infectées et être libérée dans le milieu extracellulaire sous formes soluble. Les mécanismes de sécrétion de Tat ne sont pas encore bien

maîtrisés, mais plusieurs hypothèses ont été proposées notamment un mécanisme dépendant de sa capacité à se lier avec le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (Ajasin and Eugenin, 2020; Mele et al., 2018; Rabouille, 2017). Tat peut ainsi être détectée dans plusieurs fluides biologiques (sang, liquide cébrospinal...) même chez les patients sans virémie détectable (Ajasin and Eugenin, 2020; Choi et al., 2012). Dans le sang, les concentrations de Tat peuvent aller jusqu'à 500ng/ml. Une fois libérée dans le milieu extracellulaire, Tat peut ainsi pénétrer dans toutes les cellules y compris celles non infectées par le VIH grâce à ses domaines PTD et RGD qui lui permettent d'interagir avec différents types de récepteurs cellulaires de surface (protéoglycanes heparane sulfate (HSPGs), récepteurs de chimiokines, intégrines ou récepteur des lipoprotéines (LRP-1)) et d'être internalisée par endocytose (Ajasin and Eugenin, 2020; Vendeville et al., 2004). A l'intérieur de la cellule, Tat possède une localisation à la fois nucléaire et cytoplasmique. En effet, sa petite taille favorise une diffusion passive vers le noyau à travers les pores nucléaires et son domaine NLS facilite son transport actif vers le noyau (Musinova et al., 2016). A l'intérieur du noyau, Tat n'est pas uniformément répartie et peut s'accumuler préférentiellement au niveau du nucléole (Stauber and Pavlakis, 1998).

4.3.3. Effets biologiques

Quelle que soit sa localisation, intra ou extra cellulaire, Tat peut exercer des effets biologiques sur le virus et/ou sur la cellule hôte (voir (Musinova et al., 2016) pour revue).

4.3.3.1. Tat intracellulaire

⇒ *Transcription du génome viral*

Tat est indispensable à la régulation de la transcription des gènes cellulaires nécessaires à la réplication du virus. Elle favorise le recrutement du complexe d'élongation de la transcription p-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) composé de la cycline kinase dépendante 9 (CDK9) et de la cycline T1 cellulaires (Isel and Karn, 1999; Tahirov et al., 2010). L'activation de ce complexe déclenche une cascade de phosphorylation y compris celle du domaine C-terminal de la grande sous-unité de la Pol.II avec comme conséquence une augmentation de son activité (Parada and Roeder, 1996). Tat module aussi la phosphorylation de nombreux facteurs de transcriptions tels que SP1, CREB, eIF2a et NF-KB (Romani et al., 2010). Toujours pour favoriser la transcription virale, Tat peut aussi favoriser l'acétylation des histones H3 et H4 via le recrutement d'histones acétylases avec comme conséquence une levée de l'inhibition du

promoteur viral (Easley et al., 2010; Marcello et al., 2001). Tat en lui-même peut être acétylé au niveau de sa lysine 50 favorisant sa dissociation des séquences TAR et le recrutement du complexe de modification de la chromatine SWI/SNF (Deng et al., 2000; Tréand et al., 2006) qui active la transcription en synergie avec l'acétyltransférase p300 (Mahmoudi et al., 2006; Tréand et al., 2006).

⇒ **Régulation de l'expression des gènes cellulaires**

Tat peut également via la régulation de l'expression de plusieurs gènes cellulaires exercer d'autres fonctions en dehors la transcription du génome viral. Trois mécanismes d'action par lesquels Tat peut réguler l'expression des gènes cellulaires sont décrits : liaison à des séquences TAR-like au niveau des régions 5'UTR des ARN naissant ; ii) liaison à la région promotrice des gènes cibles ; iii) interaction avec des facteurs de transcription. Tat peut ainsi transcriptionnellement réguler des centaines de gènes (Johnson et al., 2013; Kim et al., 2013b; Reeder et al., 2015). Elle peut aussi altérer l'expression de nombreux mi-ARN, intervenant ainsi dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes cellulaires (Clark et al., 2017; Sardo et al., 2016). La plupart des effets résultant de ses interactions tendent à favoriser l'activation des cellules T, la réplication et la propagation du virus dans l'organisme. Par exemple, Tat peut activer la transcription de l'IL-17 et la signalisation en amont dans les cellules T CD4⁺ avec comme conséquence leur activation indépendamment du TCR ; ce qui facilite leur infection par le VIH qui cible préférentiellement les cellules T activées (Johnson et al., 2013). En outre, Tat peut aussi moduler plusieurs processus cellulaires physiologiques tels que la réparation de l'ADN (Imai et al., 2005), l'apoptose (Campbell et al., 2004; Giacca, 2005; Selliah and Finkel, 2001), les réactions immunitaires et inflammatoires (Ben Haij et al., 2015); ou pathologiques (neurologiques, rénales, cardiovasculaires, néoplasies) liés au VIH (Ajasin and Eugenin, 2020). Nous détaillerons les potentiels effets oncogènes de Tat dans la partie 4.5.

4.3.3.2. Tat extracellulaire

Tat extracellulaire contribue aussi à la pathogénèse du VIH. En effet, Tat peut interagir avec les facteurs de la matrice extracellulaire et moduler la fonction des lymphocytes, favoriser la migration cellulaire ou exercer un effet cytopathogène sur les leucocytes et les cellules nerveuses (Bagashev and Sawaya, 2013). La protéine Tat extracellulaire peut également avoir un effet chimio-attractant pour les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques en raison d'une similarité de quelques résidus dans les domaines riches en cystéine et hydrophobes central

avec des résidus clés des β -chimiokines (Albini et al., 1998; Campbell et al., 2007). Dans l'étude de Secchiero et ses collaborateurs, Tat, immobilisée sur un substrat solide induisait à la surface des cellules TCD4⁺ l'expression du corécepteur CXCR4 requis pour l'entrée du virus dans la cellule (Secchiero et al., 1999).

4.4. Pathologies associées au VIH-1

De nombreuses pathologies bénignes et malignes sont plus fréquemment retrouvées chez les PVVIH comparées aux personnes non infectées et sont responsables d'une mortalité élevée chez les PVVIH. Les pathologies associées au VIH peuvent être réparties en deux groupes selon leur association ou pas au stade SIDA de la maladie (Tableau VI). Les pathologies non tumorales sont essentiellement infectieuses (infections opportunistes), cardiovasculaires (coronaropathie, accidents vasculaires cérébraux) (So-Armah et al., 2020), osseuses (ostéoporose, ostéopénie) (Compston, 2015), rénales (Gameiro et al., 2018), hépatiques (Sherman et al., 2019) et neurocognitifs (Eggers et al., 2017). Les pathologies malignes définissant le stade de SIDA sont représentées par le sarcome de Kaposi, les LNH agressifs (LB, LBDGC) et le cancer du col de l'utérus. D'autres cancers peuvent être retrouvés : oropharynx, anus, foie, poumons, lymphome de hodgkin, mais ne définissent pas le stade de SIDA (Lurain et al., 2019; Mitsuyasu, 2014; Phillips et al., 2008; Yarchoan and Uldrick, 2018).

Tableau VI: Pathologies associées au VIH

Pathologies bénignes	Pathologies malignes
Associées au stade SIDA de l'infection à VIH	
- Infections opportunistes (tuberculose, pneumocystose, cryptococcose neuro-méningée, candidoses, toxoplasmose cérébrale...)	- Sarcome de Kaposi - Lymphome Non Hodgkinien • LDGCB ▪ Immunoblastique ▪ Non immunoblastique ▪ Lymphome primitif du SNC ▪ Lymphome primitif des séreuses ▪ Lymphome plasmablastique • Lymphome de Burkitt - Cancers du col de l'utérus
Non associées au stade SIDA de l'infection à VIH	
- Maladies cardiovasculaires - Ostéoporose, ostéopénie - Dysfonction rénale - Dysfonction hépatique - Troubles neurocognitifs	- Lymphome de Hodgkin classique - Maladie de Castleman multicentrique associée au KSHV - Cancer à petites cellules du poumon - Cancer anal - Cancer de l'oropharynx - Carcinome hépatocellulaire - Cancers de la vulve - Cancer du pénis

LDGCB = lymphome diffus B à grandes cellules ; SNC = Système Nerveux central ; KSHV = Herpes virus associé au sarcome de Kaposi

4.5. Oncogenèse liée au VIH-1

Il existe une relation complexe entre l'infection à VIH, le traitement ARV et le développement des cancers. L'infection à VIH induit une immunodépression qui peut être jugulée par un traitement antirétroviral (ARV) bien conduit. Cette immunodépression a longtemps été considérée comme le principal facteur favorisant le développement des cancers chez les PVVIH. La restauration de l'immunité sous traitement, associée aux propriétés anti-oncogéniques de certaines molécules ARV a beaucoup contribué à réduire l'incidence des cancers VIH-induits (voir (Shmakova et al., 2020) pour revue sur les relations complexes entre VIH, cancer et traitement ARV). Cependant, plusieurs autres mécanismes en dehors de l'immunodépression peuvent expliquer la susceptibilité accrue des PVVIH à développer certains types de cancers (Figure 21).

⇒ ***Immunodépression et immunosénescence***

En plus de l'immunodépression causée par l'infection à VIH, un phénomène d'immunosénescence est également rapporté chez les PVVIH. En effet, des études ont montré que comparés à celles des sujets du même âge, l'infection à VIH conférait aux cellules immunitaires des sujets jeunes un phénotype comparable à celui des sujets âgés (cellules CD8⁺/CD28⁻ ; cellules CD4⁺/CD28⁻; augmentation des cellules CD31⁻, CD56⁺ et CD57⁺ par exemple) (Boucher et al., 1998; Effros et al., 2008; Rickabaugh et al., 2011). Ces deux facteurs, d'une part, contribuent à compromettre l'immunité anti-tumorale et d'autre part favorise l'expression de potentiels virus oncogènes, initialement présents sous forme latente. En effet, on note une plus grande prévalence des virus oncogènes chez les PVVIH (de Martel et al., 2015) et une grande partie des cancers associés au VIH sont causés par des virus oncogènes : KSHV pour le sarcome de Kaposi et le Lymphome primitif du système nerveux central; EBV pour certains LB, LBDGC et LH ; HPV pour les cancers du col de l'utérus, de l'anus et de l'oropharynx ; VHB et VHC pour les carcinomes hépatocellulaires (Lurain et al., 2019; Mitsuyasu, 2014).

⇒ ***Stimulation chronique des lymphocytes B, surproduction de cytokine et état inflammatoire chronique***

Même sous traitement ARV, il persiste une stimulation chronique des cellules du système immunitaire en particulier des lymphocytes B potentiellement à l'origine d'une lymphoprolifération, d'abord poly ou oligo-clonale mais pouvant devenir monoclonale avec un risque élevé d'acquisition d'altérations génétiques et de développement de lymphomes (Dolcetti et al., 2016). En effet, ces cellules B hyperactivées expriment l'enzyme AID qui en plus de son rôle physiologique dans les processus de SHM et de CSR favorise la formation de mutations génétiques et de translocations chromosomiques (Robbiani et al., 2009). Cette situation s'accompagne entre autres, d'une surexpression de cytokines et d'un état inflammatoire chronique qui constitue un environnement propice à la carcinogénèse (Breen et al., 2011; Vendrame et al., 2014).

⇒ ***Effets oncogéniques directs du virus et/ou de ses protéines virales***

L'avènement du traitement ARV a certes permis de réduire considérablement l'incidence de nombreux cancers associés au VIH. Néanmoins, la fréquence de certains cancers, en particulier les lymphomes associés au VIH, demeure élevée malgré la mise sous traitement, laissant

suggérer un effet oncogénique direct du VIH-1. La plupart des cancers associés au VIH touchant des cellules non ciblées par le virus, un effet oncogénique direct du VIH-1 pourrait être médié par les protéines virales qui ont la propriété d'être sécrétées par la cellule infectée et de pénétrer dans d'autres cellules non infectées par le VIH-1 (Isagulians et al., 2021).

o **La protéine Tat**

Le traitement ARV n'empêche pas la sécrétion de Tat par les cellules infectées (Mediouni et al., 2012) et il existe de plus en plus de données prouvant les effets de cette protéine dans l'initiation et ou dans la progression de nombreux types de cancers.

- *Inflammation et évasion immunitaire*

Tat contribue fortement à la modulation du système immunitaire et à l'établissement d'un environnement pro-inflammatoire en activant l'expression de nombreuses cytokines telles que TNF α , IL-6, IL-8, IL-10 (Ben Haij et al., 2013, 2015; Blazevic et al., 1996; Scala et al., 1994) et chimiokines comme CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL10 et XCL1 (Kim et al., 2004). Tat diminue fortement l'immunité à médiation cellulaire en inhibant la maturation des lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺ ou en altérant leurs fonctions (Fiume et al., 2015). Par exemple, dans les cellules T CD8⁺, Tat diminue l'expression du récepteur de l'IL-7 entraînant une diminution de leur prolifération et de leur effet cytotoxique (Faller et al., 2010, 2014), contribuant à faciliter l'évasion immunitaire.

- *Prolifération et survie cellulaire*

Tat favorise la croissance et la survie de nombreux types cellulaires (Zauli and Gibellini, 1996). En effet, *in vitro* et *in vivo*, Tat agit comme un facteur de croissance pour les cellules primaires de sarcome de Kaposi (Barillari et al., 1993; Ensoli et al., 1990). Colombrino et ses collaborateurs ont rapporté dans des cellules B immortalisées par EBV et privées de sérum dans le milieu de culture, une conservation des capacités prolifératives en présence de Tat (Colombrino et al., 2004). Une transformation tumorale a été observée dans des kératinocytes humains transfectés avec un plasmide codant pour la protéine Tat sous le contrôle du promoteur LTR du VIH-1 (Kim et al., 1992). Une surexpression de Tat peut s'accompagner d'une inhibition la transcription du gène suppresseur de tumeur p53 (Li et al., 1995). Tat peut également se lier à la protéine pRb2/p130 inhibant ainsi ses propriétés oncosuppressives et favorisant la prolifération cellulaire (Lazzi et al., 2002). Plus intéressant encore, des souris transgéniques exprimant Tat développent fréquemment des lésions hyperplasiques ou des proliférations tumorales dans différents tissus :

lymphoïde (Kundu et al., 1999; Vellutini et al., 1995), endothélial (Chen et al., 2009; Corallini et al., 1993), épidermique (Vogel et al., 1988), hépatique (Vogel et al., 1991) et colorectal (Huynh et al., 2007).

En plus de l'avantage prolifératif, Tat peut également favoriser la survie des cellules. Une résistance à l'apoptose induite par la privation de sérum dans le milieu de culture a été observée dans différentes lignées cellulaires en présence de Tat (Gibellini et al., 1995; Huynh et al., 2007; Milani et al., 1993; Zauli et al., 1993). Un effet anti-apoptotique de Tat, par induction d'une surexpression de la protéine Bcl2 a été rapporté sur des cellules Jurkatt, des cellules mononucléaires périphériques du sang (Zauli et al., 1995) et des monocytes (Zheng et al., 2007).

- *Instabilité génomique*

Tat pourrait être directement liée à la formation de translocation chromosomique dans les cellules B. En effet, Tat induit dans les cellules B circulantes l'activation de la recombinaise RAG1 qui provoque une CDB sur le locus *MYC* et en conséquence, sa relocalisation à proximité d'*IGH* (Germini et al., 2017). Cette proximité *MYC-IGH* étant une condition favorable à la formation de la translocation t(8 ;14) qui caractérise 80% des LB (voir chapitre 5). Tat favorise par ailleurs une instabilité génomique par l'induction de dommages d'ADN via la production de ROS. En effet, dans les cellules B périphériques traitées par la protéine Tat, on observe une production mitochondriale de ROS associée à une réduction des défenses antioxydantes par inhibition du glutathion avec comme conséquence l'induction de dommages d'ADN oxydatives (El-Amine et al., 2018).

- *Angiogenèse et métastase*

Tat augmente la concentration de la forme libre du facteur de croissance basique des fibroblastes (bFGF) par compétition avec sa liaison sur les protéoglycanes héparanes sulfates. Ce qui, associé à l'augmentation de l'expression des intégrines $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ également induite par Tat, favorise la croissance des cellules endothéliales et l'angiogenèse (Barillari et al., 1999a, 1999b). Tat peut également favoriser l'angiogenèse par modulation de l'activité du facteur de croissance vasculaire VEGF et de ses récepteurs (Dandachi and Morón, 2020). Il a également été montré que l'interaction de Tat avec la protéine TIP30 (*Tat interacting protein 30*) favorise l'invasion et la métastase dans certains cancers du poumon (Liu et al., 2018).

o **La protéine Nef**

Une autre protéine régulatrice du VIH, la protéine Nef est également associée à des effets oncogènes. Comme Tat, Nef est produite et sécrétée dans le milieu extracellulaire par les cellules infectées ; et est détectée dans le sérum des patients même sous ARV (Ferdin et al., 2018; Gupta et al., 2017). Dans les cellules infectées, Nef diminue l'expression des récepteurs de surfaces CD4 et CMHI, favorisant ainsi un échappement de la cellule au système immunitaire (Kirchhoff, 2013). Nef jouerait un rôle important dans les cancers du poumon associés au VIH par induction d'une prolifération des cellules pulmonaires et d'une expression exagérée de VEGF-A, favorisant l'angiogenèse (Hessol et al., 2015; Santerre et al., 2019). Elle collabore également avec la protéine K1 du KSHV favorisant une prolifération des cellules endothéliales et une angiogenèse (Xue et al., 2014; Zhu et al., 2014). Nef interagit directement avec la protéine p53 et protège les cellules contre l'apoptose induite par p53 (Greenway et al., 2002). *In vitro*, il a été montré que Nef peut passer des macrophages à l'intérieur des cellules B via un mécanisme actine-dépendant (Xu et al., 2009) et où elle pourrait induire une surexpression des gènes *MYC* et *AICDA* (Mdletshe et al., 2020).

o **Autres protéines du VIH**

D'autres protéines du VIH ont également fait l'objet d'investigations quant à leur effet oncogènes.

- **La protéine de matrice p17**

Elle mime l'activité de IL-8 en stimulant le récepteurs CXCR1 des monocytes (Giagulli et al., 2012). De plus, dans des expériences *in vivo* et *in vitro*, elle favorise une angiogenèse en se liant aux récepteurs de chimiokines CXCR1 et CXCR2 des cellules endothéliales (Caccuri et al., 2012). p17 favorise aussi la croissance des cellules B transformées *in vitro* (Martorelli et al., 2015, 2015). *In vivo*, avec des souris transgéniques, l'expression de p17 est associée au développement de leucémies/lymphomes de type pro-B (Carroll et al., 2016).

- **La glycoprotéine d'enveloppe gp120,**

En se liant à une population de cellules B exprimant les récepteurs MCLR (mannose type-C lectin receptor), la gp120 peut directement induire l'expression de l'enzyme AID (He et al., 2006), impliquée dans la formation de translocations chromosomiques dans les lymphocytes B. L'expression de ces récepteurs MCLR par les cellules B est médiée par le facteur d'activation des cellules B de la famille TNF (BAFF = *B cell activating factor of the TNF family*) produit par les

monocytes en réponse à une stimulation par le gp120 (He et al., 2006). La gp120 est également associée à la transition épithélio-mésenchymateuse et à la migration des cellules épithéliales des muqueuses orales et génitales favorisant ainsi les métastases (Lien et al., 2019).

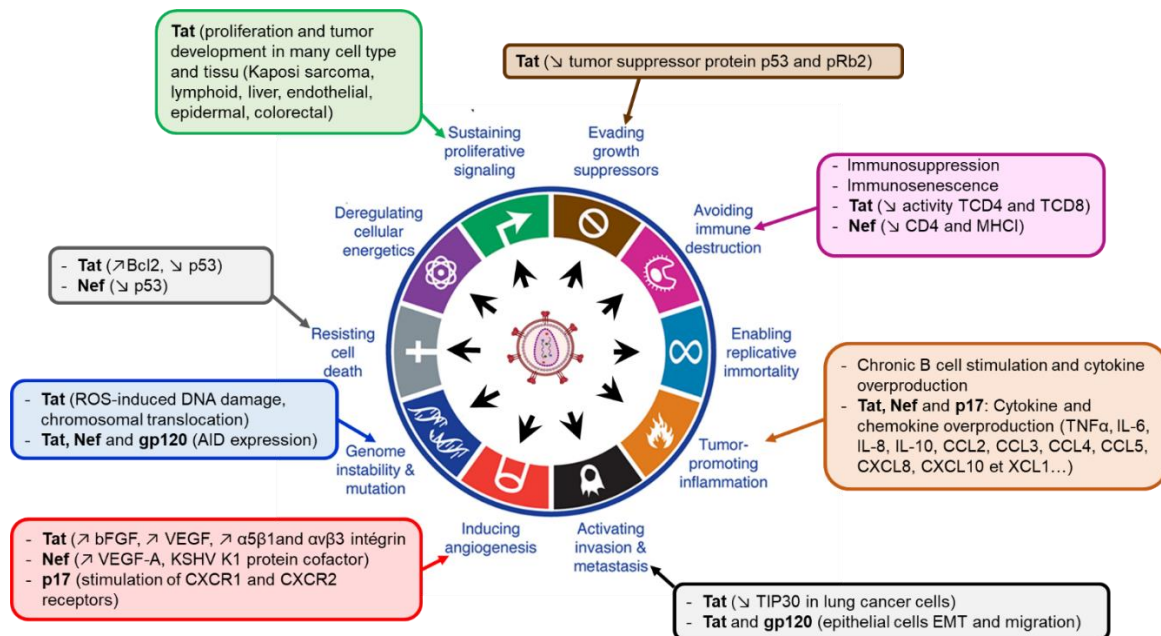


Figure 21: Potentiels effets oncogéniques du VIH-1 et de ses protéines.

Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011)

En conclusion de cette partie, nous pouvons retenir que le VIH est un rétrovirus à ARN qui infecte majoritairement les lymphocytes T CD4⁺, monocytes et macrophages. Son génome viral code une quinzaine de protéines parmi lesquelles Tat qui joue un rôle important dans la transcription du génome viral mais également dans les nombreuses pathologies associées au VIH. Tat possède un domaine de pénétration cellulaire lui permettant d'entrer dans n'importe quelles cellules, même les non-infectées, y compris les cellules B. Nous retenons aussi que le VIH est associé à de nombreux types de néoplasies. Cette oncogénicité du VIH n'est pas seulement le fait de l'immunodépression secondaire qu'il cause, mais peut être directement médié par des protéines virales, particulièrement Tat. En rapport avec la translocation t(8 ;14), Tat est impliquée dans l'induction de la proximité entre *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B. Elle favorise en même temps la production mitochondriale de ROS, sources de dommages d'ADN. Nous envisageons d'explorer une éventuelle interaction avec le gène *AICDA* qui code pour l'enzyme AID, impliquée dans la formation de cette t(8 ;14).

5. Lymphome de Burkitt

Après une première partie de définition et de rappels historiques, nous aborderons dans cette partie les différentes formes cliniques du LB suivies de leurs profils cytogénétiques et moléculaires. Nous terminerons par une partie sur l'étiopathogénie de ce lymphome où nous discuterons l'origine de la cellule du LB, les conséquences de la surexpression de l'oncogène *MYC*, ainsi que les données existantes sur rôle spécifique joué par les différents facteurs étiologiques (EBV, VIH, *Plasmodium falciparum* et autres facteurs...).

5.1.	Définition et historique	130
5.2.	Formes cliniques	131
5.2.1.	La forme endémique (LBe)	131
5.2.2.	La forme sporadique (LBs)	131
5.2.3.	La forme liée à un déficit immunitaire	131
5.3.	Profil cytogénétique et moléculaire	132
5.4.	Etiopathogénie	135
5.4.1.	Origine de la cellule du LB	135
5.4.2.	Rôle de la surexpression de MYC	136
5.4.3.	Rôle du virus EBV	137
5.4.4.	Rôle du VIH	140
5.4.5.	Rôle du <i>Plasmodium falciparum</i>	141
5.4.6.	Autres facteurs étiologiques	143

5.1. Définition et historique

Le LB est un LNH de type B très agressif caractérisé sur le plan cytogénétique et moléculaire par une translocation chromosomique impliquant l'oncogène *MYC* situé sur le chromosome 8 et l'un des gènes des chaînes d'Ig *IGH*, *IGK* et *IGL* situés respectivement sur les chromosomes 14, 2 et 22. Ce type de lymphome touche essentiellement les enfants, représentant 1 à 2% des lymphomes chez l'adulte mais jusqu'à 25-40% chez l'enfant (Atallah-Yunes et al., 2020; Ishizawa, 2019).

Déjà au milieu du 20^{ème} siècle, Albert Cook décrivait une fréquence élevée de tumeurs développées aux dépens de la mâchoire chez des enfants en Afrique centrale et orientale (Davies, 1947; Elmes and Baldwin, 1947; Thijs, 1957). C'est après sa description en 1958 par Denis Burkitt en Ouganda (Burkitt, 1958) que le terme « Lymphome de Burkitt » sera utilisé par la suite. Ce lymphome représentait presque la moitié des cancers de l'enfant en Ouganda. Plus tard, il a été constaté que ce type de lymphome était réparti dans une zone géographique particulière qui sera nommée « la ceinture africaine du lymphome » (*african lymphoma belt*) (Burkitt, 1962a; Rochford and Moormann, 2015). Cette ceinture correspond aux zones de basse altitude, avec un climat chaud et humide (Burkitt, 1962b, 1962a) mais également à la zone de distribution de plusieurs espèces de moustiques (Haddow, 1963). Ces observations ont fait suggérer l'implication d'un vecteur, probablement viral (arbovirus) dans la survenue de cette pathologie. En 1964, Epstein et ses collaborateurs ont découvert dans les cellules tumorales de LB d'un ougandais le virus EBV (Epstein et al., 1964), qui par la suite sera retrouvé associé à toutes les formes de LB africain. En 1966, le même type de tumeur est rapporté en Papouasie et Nouvelle Guinée où on retrouve les mêmes conditions climatiques que dans la ceinture du lymphome, en plus d'une présence holo-endémique du *P. falciparum* dans les deux régions (Seldam et al., 1966). Vers la fin des années 1960, l'hypothèse d'une implication du paludisme dans la survenue du LB paraît de plus en plus évidente (Burkitt, 1969). En 1975, une translocation impliquant les chromosomes 8 et 14 a été découverte dans les cellules de LB (Zech et al., 1976) puis quelques années plus tard, l'oncogène *MYC* a été identifié aux points de jonction de la translocation à proximité d'*IGH* (Dalla-Favera et al., 1982; Taub et al., 1982). Cette forme de LB retrouvée en Afrique est qualifiée d'endémique (LBe). Vers 1982, les premiers cas de LB associés au VIH (LBv) ont été décrits (Doll and List, 1982; Ziegler et al., 1982). D'autres formes de LB ont été décrites dans plusieurs régions du monde dépourvus de paludisme, avec une présentation clinique

différente et une présence inconstante du virus EBV. Actuellement, trois variantes cliniques du LB sont ainsi décrites : sporadique , endémique et associée aux déficits immunitaires (Jaffe, 2009).

5.2. Formes cliniques

5.2.1. La forme endémique (LBe)

Elle est retrouvée essentiellement en Afrique subsaharienne et en Papouasie-Nouvelle Guinée dans les zones où le paludisme est endémique et caractérisées par une séroconversion précoce à EBV (Burkitt, 1962c, 1962a; Rainey et al., 2007; de-The, 1977). Le LBe est systématiquement associé au virus EBV. Sur le plan clinique, elle touche essentiellement les enfants âgés entre 2 et 15 ans avec un pic d'incidence à 6 ans. Son incidence annuelle est estimée à 40-50 par million de personnes de moins de 18 ans (Orem et al., 2007). Il représente environ la moitié des lymphomes diagnostiqués chez l'enfant dans ces zones (Hämmerl et al., 2019). Sur le plan clinique, il se présente le plus souvent sous la forme d'une tumeur de la mâchoire ou d'une tumeur intra-abdominale (Brady et al., 2007; Rochford and Moormann, 2015).

5.2.2. La forme sporadique (LBs)

Elle est retrouvée partout dans le monde, plus fréquemment chez les enfants que chez l'adulte (4 par million d'enfants de moins de 16 ans versus 2.5 par million d'adultes) (Graham and Lynch, 2020). L'épidémiologie du LBs est variable selon la région géographique. L'Europe du nord et de l'est sont considérés comme des régions à faible risque avec une faible association à EBV (15-20%). En revanche, il est plus fréquent dans certaines zones d'Amérique du Sud comme le Brésil avec une association au virus EBV plus fréquente pouvant atteindre 85% (Kelly and Rickinson, 2007). L'abdomen, particulièrement la région iléo-caecale est le plus souvent touché (Ferry, 2006).

5.2.3. La forme liée à un déficit immunitaire

Elle survient essentiellement chez les personnes adultes infectées par le VIH (LBv) où elle représente environ 30 à 40% des lymphomes associés au VIH (Blum et al., 2004; Knowles, 2003). Comparés aux autres lymphomes associés au VIH, le LBv est observé chez des sujets plus jeune, sans diagnostic antérieur de SIDA et avec un taux de CD4 plus élevé (> 200 cellules TCD4⁺ / μ l) (Casulo and Friedberg, 2018; Ferry, 2006; Molyneux et al., 2012) suggérant que l'immunodéficience à elle seule n'explique pas le développement de ce type de lymphome. En effet, malgré l'avènement de la trithérapie ARV, le LB demeure 30 à 50 fois plus fréquent chez

les personnes vivantes avec le VIH (PVVIH) que dans la population générale (Gibson et al., 2014). D'autres causes d'immunodépression telles que la transplantation ou les déficits immunitaires congénitaux peuvent favoriser le LB mais à un degré moindre (Gong et al., 2003; Xicoy et al., 2003). Le virus EBV est inconstamment associé à cette forme clinique avec une fréquence d'environ 40% (Molyneux et al., 2012)

5.3. Profil cytogénétique et moléculaire

⇒ **Profil cytogénétique**

Quelle que soit la forme clinique, le LB est caractérisé par une translocation chromosomique réciproque entre le chromosome 8 et l'un des chromosomes 2, 14 ou 22. Dans 80% des cas il s'agit de la t(8;14) qui implique l'oncogène *MYC* situé sur le bras long du chromosome en 8q24.13 et le gène des chaînes lourdes d'Ig *IGH* situé sur le bras long du chromosome 14 en 14q32.33. Dans les autres cas, *MYC* est recombiné avec l'un des gènes des chaînes légères d'Ig : *IGK* en 2p12 dans la t(2;8) ou *IGL* en 22q11 dans la t(8;22) dans 15% et 5% des cas respectivement (Atallah-Yunes et al., 2020). Dans 10% des LB, les techniques de cytogénétiques conventionnelles ne permettent cependant pas de mettre en évidence une translocation (Molyneux et al., 2012). Les points de cassure sur *MYC* varient en fonction du type de translocation (Figure 22A). Dans la t(8;14) on note une cassure centromérique de *MYC* et donc l'activation de *MYC* est observée sur le chromosome dérivé 14. A l'opposé, elle est observée sur le chromosome dérivé 8 dans les variantes t(2;8) et t(8;22) en raison d'une cassure télomérique de *MYC* (Pelicci et al., 1986; Shiramizu et al., 1991) (Figures 22A, C, D, E et F). Les points de cassure sur les deux chromosomes varient également en fonction de la forme clinique (Figures 22A et B). Dans le LBe, le point de cassure sur le chromosome 8 se situe en général à plus de 100 kb en amont du 1^{er} exon de *MYC* et celui sur le chromosome 14 au niveau du segment J du locus *IGH*. Cette configuration place *MYC* sous le contrôle du promoteur E μ d'*IGH* (Figure 22C). En revanche, dans les deux autres formes cliniques, le chromosome 8 est cassé entre les exons 1 et 2 de *MYC* et le chromosome 14 au niveau du segment S (switch) d'*IGH* (Figure 22D). Dans ce cas, le promoteur E μ d'*IGH* est éliminé durant la translocation et *MYC* serait sous le contrôle d'autres promoteurs tel que E α . Cependant, cette règle n'est pas stricte et des points de cassure au niveau de la région J d'*IGH* ont été rapportés dans des cas de LBs au stade leucémique (Burmeister et al., 2013). D'autres anomalies cytogénétiques additionnelles telles que les

délétions 13q ou 17p peuvent être présentes et sont souvent associées à un pronostic clinique plus sévère (Said et al., 2014).

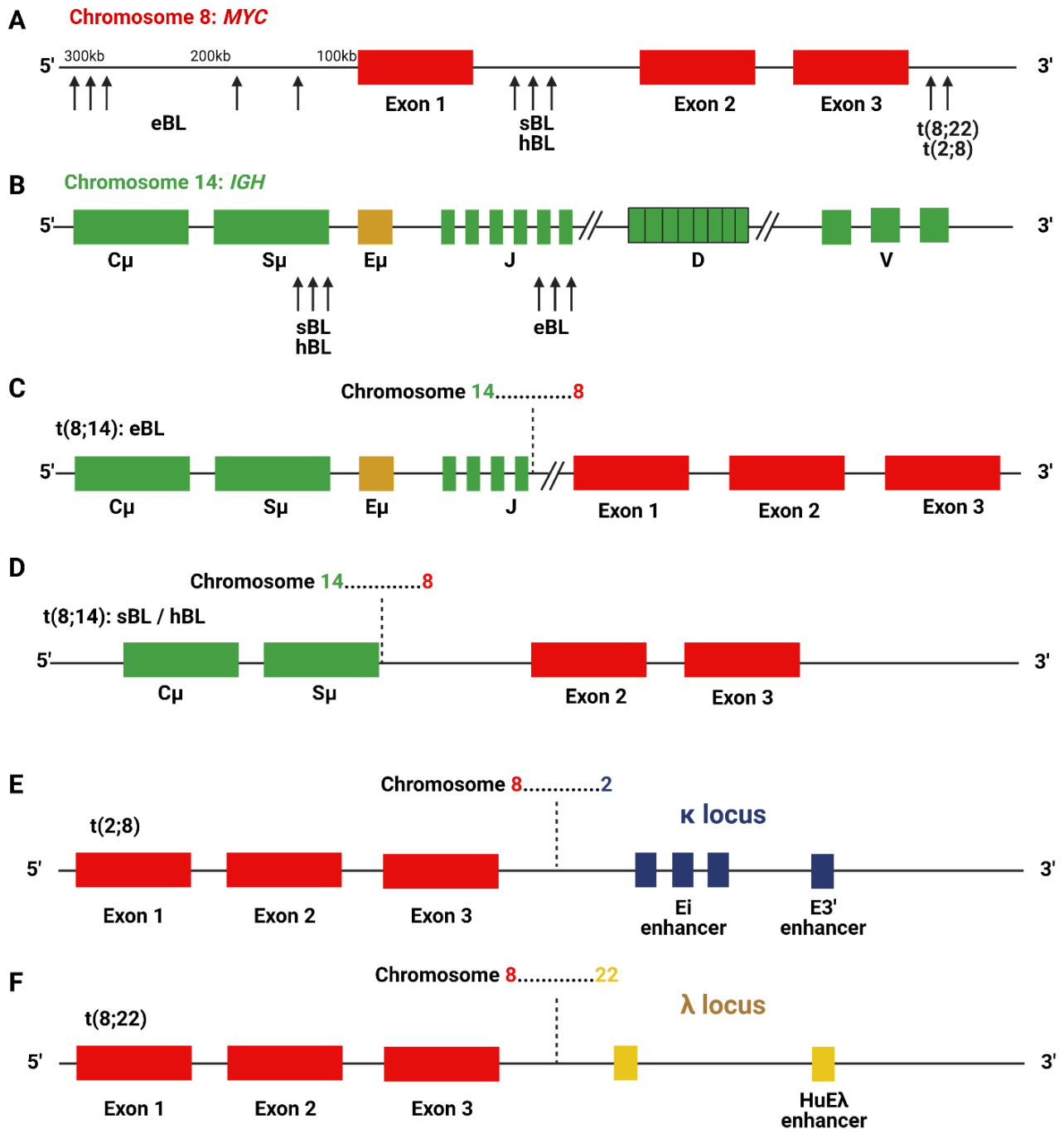


Figure 22: Position des points de cassure de *MYC*, *IGH*, *IGK* et *IGL* au cours des Lymphomes de Burkitt endémique, sporadique et associé au VIH

A) Position des points de cassures de *MYC* pour la t(8;14) dans les différentes formes cliniques de LB et pour les t(2;8) et t(8;22). B) Position des points de cassures d'*IGH* au cours de la translocation t(8;14). C) Chromosome dérivé 14 après la translocation t(8;14) dans le LB endémique. D) Chromosome dérivé 14 après la translocation t(8;14) dans les LB sporadiques et associés au VIH. E) Chromosome dérivé 8 après la translocation t(2;8). F) Chromosome dérivé 8 après la translocation t(2;8). Adapté de (Blum et al., 2004).

⇒ **Profil moléculaire**

Une caractéristique indispensable retrouvée dans tous les LB est la surexpression de la protéine MYC pouvant découler de plusieurs mécanismes. Les translocations chromosomiques sus-décrits juxtaposent les séquences codantes de *MYC* à côté des séquences des puissants promoteurs des gènes d'Ig ; ces derniers étant capable d'activer la transcription de gènes pouvant être situés jusqu'à 500kb. Il en résulte ainsi une augmentation de la transcription de *MYC* et par conséquent une surexpression de la protéine (Hayday et al., 1984; ar-Rushdi et al., 1983). De plus, les séquences inhibitrices situées au niveau de l'exon 1 et de l'intron 1 du locus *MYC* sont soit éliminées pendant la translocation (LBs ou LBv), soit connaissent des mutations inactivatrices (LBe), participant ainsi à la surexpression de *MYC* (Hecht et Aster 2000; Cesarman et al. 1987 ; Zajac-Kaye, Gelmann, et Levens 1988). A l'échelle de la protéine, des mutations au niveau de l'exon 2 peuvent entraîner une substitution d'acides aminés rendant la protéine plus stable ou diminuant sa dégradation par le protéasome (Bahram et al., 2000; Flinn et al., 1998; Gregory and Hann, 2000; Salghetti et al., 1999). L'importance de ces mutations de *MYC* sur le phénotype tumoral du LB a été confirmée par l'observation selon laquelle des souris transgéniques avec un gène sauvage de *MYC* mis sous le contrôle d'un promoteur *IGH* développent certes des tumeurs mais de type pro-B, phénotypiquement différentes du LB (Adams et al., 1985). Deux cent vingt-trois mutations de *MYC* sont répertoriées dans la MYCbase publiée par Chakravorty et ses collaborateurs (Chakravorty et al., 2017). D'autres anomalies moléculaires découlant directement ou pas de la dérégulation de MYC ont été décrites au cours du LB et participent à l'oncogenèse : mutations de *TP53* (Ferry, 2006; Kelly and Rickinson, 2007; Molyneux et al., 2012), *CCND3* (Schmitz et al., 2014), *TCF3 (E2A)* et de son régulateur négatif *ID3* (Richter et al., 2012; Schmitz et al., 2014). Une étude de profilage d'expression génique réalisée par Dave et ses collaborateurs a identifié une signature moléculaire du LB caractérisée par : i) une surexpression de *MYC* et de ses gènes cibles ; ii) l'expression d'un sous-groupe de gènes du CG des cellules B ; iii) une diminution de l'expression des gènes du *CMHI* et iv) une diminution de l'expression des gènes cibles de *NF-KB* (Dave et al., 2006). Dans une revue récente, Hutcheson et ses collaborateurs ont répertorié une liste de gènes fréquemment mutés au cours du LB dont certaines mutations médiée par des off-target de l'enzyme AID (Hutcheson et al., 2020).

5.4. Etiopathogénie

5.4.1. Origine de la cellule du LB

Plusieurs arguments sont en faveur du CG des organes lymphoïdes secondaires comme origine de la cellule tumorale du LB. En effet, indépendamment de la variante clinique, les caractéristiques phénotypiques des cellules tumorales au cours du LB sont similaires à celles des cellules B du CG : CD10⁺, Bcl6⁺, Bcl2⁻ et presque 100% de positivité au Ki67 (Ferry, 2006). De plus, l'analyse de la séquence des régions variables des chaînes d'Ig dans les différents types de LB montrent que les cellules ont déjà subi le processus de SHM qui a lieu normalement dans le CG en présence de l'enzyme AID (Chapman et al., 1998; Eclache et al., 1996; Jain et al., 1994; Ng and McGrath, 1998). Cependant, des études ont montré que la surexpression de MYC – qui est constante au cours du LB – pouvait conférer aux cellules un phénotype du CG (Pajic et al., 2001; Polack et al., 1996). En plus, une expression ectopique d'AID suffit à induire au bout de quelques heures la formation de la translocation *MYC-IGH* dans des cellules B murines (Ramiro et al., 2004, 2006). Ces données suggèrent que la cellule peut acquérir la translocation en dehors du CG avec comme conséquence une surexpression de MYC et l'acquisition d'un phénotype du CG.

Par ailleurs, si l'origine de la cellule tumorale semble être la même quel que soit le type de LB, l'étape de différenciation des cellules B au cours de laquelle apparaît la translocation semble varier en fonction du type de LB. Dans les LBs et LBv, la position des points de cassures chromosomiques au niveau de la région switch du locus *IGH* suggère fortement que la translocation a eu lieu au moment de la recombinaison de classe médiée par AID dans le CG (Hecht and Aster, 2000). En revanche, dans le LBe, la position des points de jonction au niveau de la région JH du locus d'*IGH* plaide plus en faveur de CDBs survenue au cours de la recombinaison V(D)J médiée par les recombinaisons RAG1 et 2 au stade de cellule pré-B, et donc dans la moelle osseuse (Bornkamm et al., 1987; Haluska et al., 1986). Dans ce cas, c'est un événement nouveau comme une infection par EBV et/ou l'acquisition de nouvelles mutations dans le CG qui conférerait à la cellule le phénotype tumoral. Mais, une réexpression des RAG dans le CG a été rapportée dans des cellules B murines matures (Han et al., 1997; Hikida et al., 1996; Ohmori and Hikida, 1998) suggérant que la translocation au cours du LBe pourrait également survenir dans le CG. On pourrait également spéculer sur la possibilité d'une translocation survenant dans le CG et médiée par AID qui ciblerait des séquences inhabituelles du locus *IGH* comme le segment J.

5.4.2. Rôle de la surexpression de MYC

MYC est une protéine de 64kDa appartenant à la famille des facteurs de transcription bHLH (*basic helix-loop-helix*) qui régule l'expression d'environ 15% des gènes cellulaires (Dang et al., 2006). Elle intervient ainsi dans de nombreux processus cellulaires tels que la progression du cycle cellulaire, la croissance, le métabolisme, l'apoptose et la senescence (Dang et al., 2006; Hoffman and Liebermann, 2008; Nilsson and Cleveland, 2003). La surexpression de MYC dans les cellules B contribue à l'acquisition d'un phénotype tumoral par les cellules (Figure 23). Elle est associée à une progression du cycle cellulaire et une prolifération incontrôlée en l'absence de signal mitogène. La dérégulation de MYC s'accompagne normalement d'une sensibilité accrue à l'apoptose. Cependant, dans le LB, différents mécanismes contribuent à contrecarrer l'effet pro-apoptotique de MYC. Des mutations fréquentes sur le gène *TP53* inhibent l'apoptose p53 dépendante. On peut également observer une augmentation de Mdm2, un régulateur négatif de p53 (Eischen et al., 1999; Kelly and Rickinson, 2007; Lindström and Wiman, 2002); une mutation sur *MYC* affectant sa capacité à activer la protéine pro-apoptotique Bim (Adhikary and Eilers, 2005; Hemann et al., 2005) ou encore un effet anti-apoptotique exercé par les protéines du virus EBV telle que EBNA1 (Lu et al., 2011). MYC confère aux cellules un phénotype non immunogénique avec diminution de l'expression des molécules du CMHI, une diminution des molécules d'adhésion, une altération de la voie NF-KB et une diminution de la réponse aux IFN de type 1 favorisant ainsi l'échappement de la cellule au système immunitaire (Polack et al., 1996; Schlee et al., 2007; Staeger et al., 2002). De plus, MYC est associée à une inhibition de la différenciation cellulaire, une altération du métabolisme cellulaire, une augmentation de l'activité des télomérases et favorise aussi l'angiogenèse et l'instabilité génomique (Adhikary and Eilers, 2005). La figure 27 récapitule les effets oncogéniques de MYC revue dans (Allday, 2009; Hecht and Aster, 2000; Korać et al., 2017; Nguyen et al., 2017)

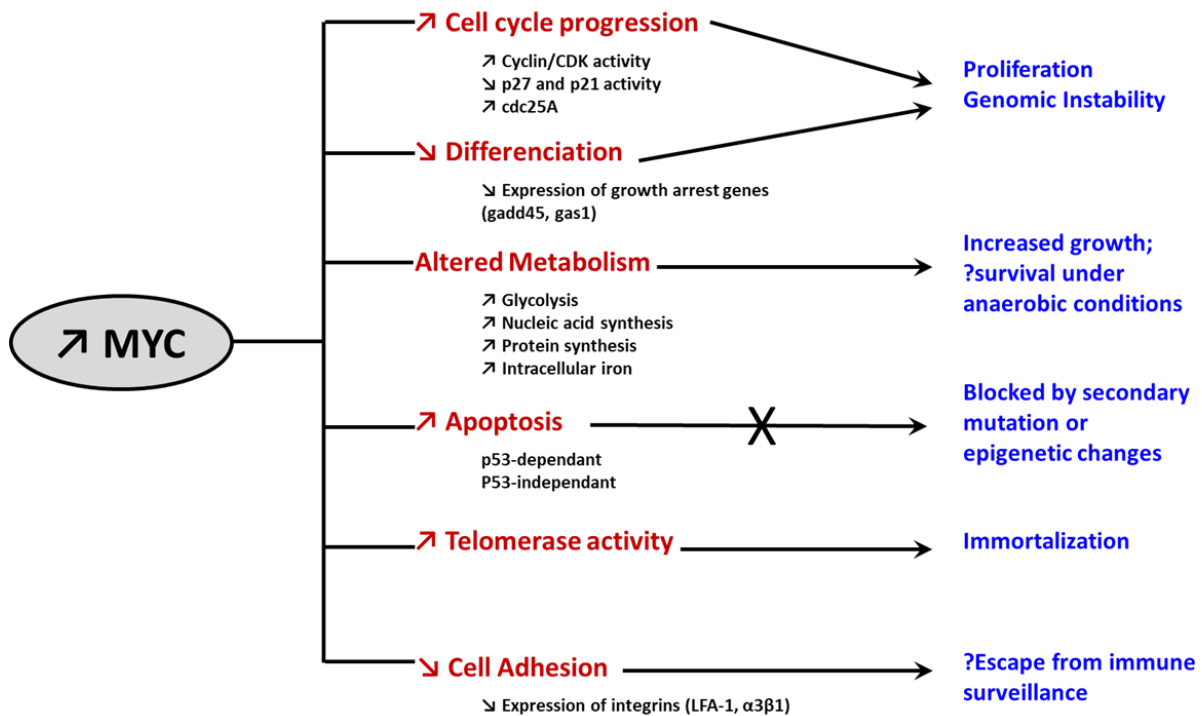


Figure 23: Résumé des effets biologiques oncogéniques de la surexpression de MYC

Adapté de (Hecht and Aster, 2000))

5.4.3. Rôle du virus EBV

La présence du virus EBV est quasi systématique dans le LBe, suggérant un rôle direct de ce virus dans le développement de cette pathologie, même si les mécanismes ne sont pas encore totalement maîtrisés. Sa présence est moins constante dans les deux autres formes. Deux théories existent par rapport à l'étape à laquelle EBV interviendrait dans la pathogenèse du LB. Dans le premier modèle, une infection précoce des enfants au virus EBV serait la première étape. Il en résulte une immortalisation des cellules B infectées dans un contexte de tolérance immunitaire qui favorise la prolifération des cellules. Cette situation est exacerbée par un contexte particulier d'infection à *P. falciparum* qui stimule l'expansion clonale des cellules B et supprime la réponse cellulaire T cytotoxique anti-EBV (voire chapitre 5.4.5). La dernière étape serait alors l'apparition de la translocation et le développement du clone malin (Allday, 2009; Klein, 1979). Le deuxième modèle suggère que la formation de la translocation t(8 ;14) constitue la 1^{ère} étape et surviendrait soit au moment de la recombinaison V(D)J au stade de pré-B, soit dans le CG. L'activation des cellules B naïves par une stimulation spécifique ou non (infections répétées au *P. falciparum* ou VIH) entraîne leur prolifération et augmente la probabilité de survenue d'événements mutagéniques secondaires. C'est seulement après que survient

l'infection à EBV qui immortalise la cellule (Allday, 2009; Bornkamm et al., 1987). Cependant, le taux de croissance rapide des cellules du LB avec un temps de dédoublement de 24-48h semble être une réponse immédiate de la surexpression de MYC en réponse à la translocation, ce qui plaide plus en faveur du premier modèle. De plus, la séroconversion à EBV est très précoce en Afrique et pratiquement à 3ans tous les enfants africains sont EBV positifs (de-Thé et al., 1978). Dans l'étude de Jayasooriya, 86% d'une cohorte d'enfants gambiens âgés au maximum de 24mois avaient une sérologie EBV positive (Jayasooriya et al., 2015). Mieux encore, des titres élevés d'anticorps anti VCA sont retrouvés chez ces enfants jusqu'à 6 ans avant le développement de la tumeur (Geser et al., 1982; de Thé, 1997) renforçant l'hypothèse d'une intervention très précoce du virus EBV dans le processus. Un autre argument qui corrobore le premier modèle est le fait que le virus EBV infecterait plutôt les cellules B naïves. Cependant, certains auteurs rapportent la possibilité pour EBV d'infecter directement des cellules B activées ou mémoires (Babcock et al., 2000; Ehlin-Henriksson et al., 2003; Mancao et al., 2005; Roughan and Thorley-Lawson, 2009; Siemer et al., 2008) si bien que les deux théories pourraient ne pas être mutuellement exclusives (Figure 24).

Dans le CG où la translocation est supposée se produire, les cellules EBV+ sont en latence de type II et expriment les protéines LMP1, LMP2, EBNA1 et les transcrits non-codant EBERs qui vont contribuer à lutter contre l'apoptose induite par MYC. LMP1 peut également induire la transcription d'*AICDA* (Kim et al., 2013a) augmentant la probabilité d'une expression aberrante et donc le risque de translocation. A l'état normal, les cellules vont éteindre l'expression des protéines LMP1 et 2, sortir du CG et se différencier en cellules mémoires qui expriment occasionnellement la protéine EBNA1 au cours du cycle cellulaire. En revanche, la prolifération induite par la surexpression de MYC dans les cellules avec la translocation empêche la différenciation des cellules en B mémoire et maintient les cellules en cycle, d'où l'expression isolée d'EBNA1 dans les LB (Figure 24). Dans 15% des LBe (*Wp-restricted BL*), on retrouve un profil atypique avec l'expression additionnelle des protéines EBNA3 et d'une forme tronquée de la protéine EBNA-LP en rapport avec une délétion du gène EBNA2 (Hutcheson et al., 2020).

En plus de son rôle dans l'immortalisation et la transformation des cellules B, dans la résistance à l'apoptose, EBV est associé à une dérégulation épigénétique de l'expression de nombreux

gènes y compris TCF3 et ID3 qui sont fréquemment muté dans les LB EBV négatifs (Hernandez-Vargas et al., 2017; Niller et al., 2016; Takacs et al., 2009).

Le caractère inconstant du virus EBV dans les autres formes de LB soulève la question du caractère indispensable du virus dans la pathogenèse de ces tumeurs. Dans ces formes, c'est une activation des cellules B naïves en réponse à une stimulation spécifique ou non qui serait le premier évènement. Ces cellules activées vont migrer vers le CG où l'activation d'AID pour initier la CSR ou la SHM pourrait favoriser l'acquisition de mutations génétiques et la formation de la translocation. En l'absence d'un avantage de sélection qui va déséquilibrer la balance des facteurs pro et anti-apoptotiques, ces cellules seront normalement éliminées (Figure 24) (Allday, 2009). Les travaux de Grande et al ont montré que les LB EBV positives avaient significativement moins de mutations, en particulier sur les gènes régulant l'apoptose que les LB EBV négatives (Grande et al., 2019). Il semble ainsi que les cellules tumorales EBV négatives accumulent des mutations pour compenser l'absence du virus EBV (revue dans (Hutcheson et al., 2020)). Cependant, la probabilité d'accumuler spontanément dans la même cellule plusieurs lésions oncogéniques reste rare, et pourrait expliquer la faible fréquence du LBs. On pourrait également spéculer sur l'existence d'autres facteurs de risque non encore identifiés pour les LBs. Certains auteurs soutiennent que l'absence du virus EBV dans les cellules tumorales des LBs et LBv découle d'une perte de l'épisome viral au cours de la division cellulaire (Rochford and Moormann, 2015).

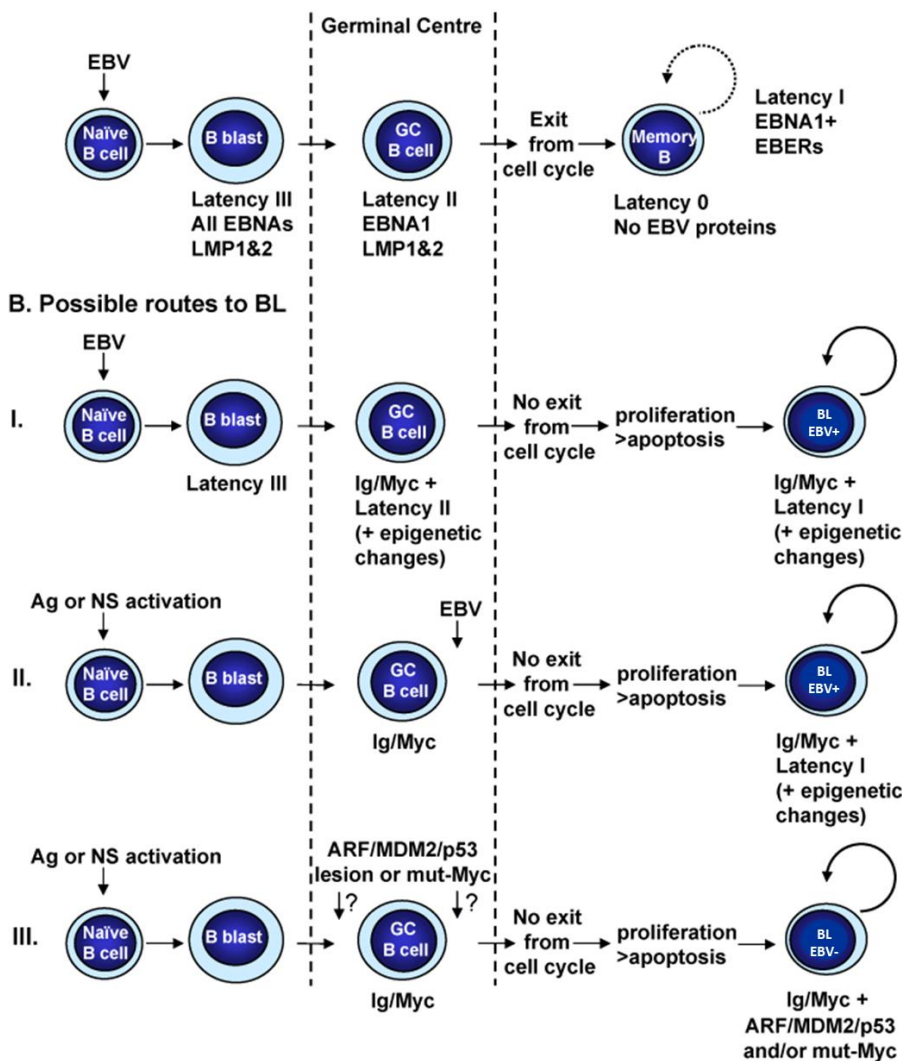
A. Normal EBV persistence

Figure 24: Modèles proposés pour la pathogenèse des LB EBV positifs et négatifs.

(A) Etablissement de la persistance du virus EBV dans les lymphocytes B à l'état normal avec la succession des différents types de latence (voir chapitre EBV pour plus de détails). **(B)** Les différents modèles proposés pour le LB. (I) Infection des cellules B naïves qui vont s'activer et migrer vers le CG où se produit la translocation *MYC-IGH* au cours de l'hypermutation somatique, qui maintient les cellules en prolifération avec expression d'EBNA1 et des EBERs (Latence I) et inhibition de l'apoptose induite par la surexpression de MYC (soit par EBNA1 ou des mutations additionnelles). (II) Même chose qu'en I mais ici les cellules B sont activées par un antigène ou une stimulation polyclonale non spécifique comme celle observée au cours du VIH ou du paludisme et l'infection par EBV survient après la formation de la translocation *MYC-IGH* dans le CG. (III) Les cellules B sont activées par un antigène ou une stimulation non spécifique ; elles migrent dans le CG où se produit la translocation *MYC-IGH* associées à des mutations additionnelles sur *MYC* ou sur l'axe ARF/MDM2/p53 permettant d'inhiber l'apoptose induite par la surexpression de MYC et de maintenir les cellules en cycle. (adapté de (Allday, 2009))

5.4.4. Rôle du VIH

Les mécanismes par lesquels le VIH favorise le développement des lymphomes sont encore incomplètement élucidés. L'immunodépression induite par le virus chez les PVVIH a été pendant longtemps considérée comme une pièce motrice dans le développement des néoplasies

associées au VIH. Cependant, la fréquence du LB demeure encore 30 à 50 fois plus élevée chez les PVVIH comparés à la population générale et ce, malgré l'avènement de la trithérapie ARV (Gibson et al., 2014). Ce qui n'est pas le cas pour les autres types de LNH associés au VIH tels que les LBDGC ou les Lymphomes du système nerveux central qui ont vu leur incidence baisser (Gibson et al., 2014; Hernández-Ramírez et al., 2017; Linke-Serinsöz et al., 2017). Mieux encore, Le LB survient chez les PVVIH avec un taux relativement élevé de CD4 (Casulo and Friedberg, 2018; Ferry, 2006; Molyneux et al., 2012), suggérant que l'existence d'autres mécanismes d'oncogenèse induite par le VIH en dehors de l'immunodépression (voire Chapitre 4.5).

Le VIH favoriserait ainsi le développement du LB par l'intermédiaire d'une stimulation antigénique chronique des cellules B à l'origine d'une prolifération polyclonale pouvant devenir monoclonale par la suite. En effet, des taux circulants élevés de marqueurs d'activation des lymphocytes B comme le CD23 et le CD30, sont retrouvés chez les PVVIH avant l'apparition du LB (Breen et al., 2006; Grulich et al., 2000; Yawetz et al., 1995). Cette activation des cellules B induit parallèlement l'expression de l'enzyme AID dans le CG où elle favorise la formation de la $t(8;14)$. AID est aussi détectée dans les lymphocytes B des PVVIH atteints de lymphome comparés aux sujets sains ou aux PVVIH indemnes de lymphome (Epeldegui et al., 2007). Une surexpression de l'AID par un effet direct des protéines virales telle que gp120 (He et al., 2006) ou par activation des cellules B via le CD40L associé aux particules virales a été rapportée (Imbeault et al., 2011; Martin et al., 2007). Notre équipe a également montré que la protéine Tat du VIH pouvait favoriser dans les lymphocytes B circulant, par un mécanisme dépendant des RAG, la relocalisation de *MYC* à proximité d'*IGH* (Germini et al., 2017) augmentant ainsi la probabilité de translocation entre les deux loci. Tat peut également induire des dommages oxydatifs sur l'ADN, source d'instabilité génomique (El-Amine et al., 2018)

5.4.5. Rôle du *Plasmodium falciparum*

Plusieurs études ont montré une relation entre le LBe et le paludisme à *P. falciparum* (Bouvard et al., 2012; Carpenter et al., 2008; Emmanuel et al., 2011; Mutalima et al., 2008). Burkitt en 1962 et Dalldorf en 1964 avaient pour la première fois, sur la base d'une distribution géographique du LBe superposable aux zones d'endémie palustre, suggéré un rôle étiologique du paludisme dans la survenue du LBe (Burkitt, 1962b; Dalldorf et al., 1964; Kafuko and Burkitt, 1970). Par la

suite, plusieurs arguments ont confirmé cette hypothèse. Une sensibilité accrue au développement de lymphome a été observée chez les souris exposées de façon chronique au *Plasmodium* (Kafuko and Burkitt, 1970). D'autre part, une nette diminution de l'incidence du LBe a été notée dans certains pays parallèlement à l'application des mesures de lutte contre le paludisme (Guech-Ongey et al., 2012; Mutalima et al., 2008). Le risque de développer un LBe augmenterait également avec le nombre de traitement antérieur anti-palustre et donc avec le nombre d'épisode antérieur de paludisme (Carpenter et al., 2008). Des études plus récentes réalisées en Uganda et au Malawi ont montré un risque de développer un LBe 5 à 12 fois plus élevé chez les sujets présentant un taux élevé d'anticorps dirigés contre des extraits de schizontes de *P. falciparum* (Aka et al., 2013; Carpenter et al., 2008; Mutalima et al., 2008).

Dans la pathogenèse du LBe, *P. falciparum* agirait en potentialisant l'effet du virus EBV. En effet, le LBe est 13 fois plus fréquent chez les enfants co-infectés par EBV et *P. falciparum* (Chene et al., 2009; Mutalima et al., 2008; Rochford et al., 2005). En plus d'une stimulation polyclonale des lymphocytes B, *P. falciparum*, via une interaction du domaine CIDR1 α (*Cysteine-rich interdomain region 1 α*) de sa protéine PfEMP1 (*P. falciparum* erythrocyte membran protein 1) exprimé par les érythrocytes infectés, favoriserait la réactivation du virus EBV dans les cellules B mémoires (Chêne et al., 2007; Donati et al., 2004). Des études sérologiques ont confirmé que les enfants co-infectés par EBV et *P. falciparum* font plus d'épisodes de réactivation avec des taux d'IgG anti VCA, anti-EA-D et anti-Zebra plus élevés comparés aux enfants non infectés par *P. falciparum* (Carpenter et al., 2008; Piriou et al., 2009). De plus, une infection aigue à *P. falciparum* est associée à des charges virales EBV élevées (Nije 2009, Donati 2006 de Roch 2015). L'augmentation du pool de cellules B infectées par EBV en conséquence de la réactivation virale est associée à une diminution de la réponse immunitaire T cytotoxique anti-EBV, également induite par *P. falciparum* (Chattopadhyay et al., 2013; Snider et al., 2012). Parallèlement à son rôle de cofacteur du virus EBV, *P. falciparum* pourrait avoir un effet direct sur la formation de la translocation *MYC-IGH* en induisant une expression aberrante d'AID via une signalisation dépendante du TLR9 (Capolunghi et al., 2008; Parroche et al., 2007; Potup et al., 2009).

5.4.6. Autres facteurs étiologiques

⇒ ***Euphorbia tirucalli***

E. tirucalli est une plante très répandue en Afrique avec une répartition géographique superposable à la ceinture du lymphome. Elle y est utilisée à visée ornementale ou médicinale et parfois les enfants peuvent jouer avec son latex de consistance caoutcheuse (MacNeil et al., 2003). Cette plante a été plus fréquemment retrouvée dans les maisons des enfants atteints de LBe que dans celles des enfants sains (van den Bosch et al., 1993; Mizuno et al., 1986; Osato et al., 1987). Le latex d'*E. tirucalli* contient une substance, le 4-deoxyphorbol ester (Osato et al., 1987, 1990), très proche du promoteur de tumeur TPA, un phorbol ester isolé de l'huile de croton elle-même extraite à partir d'une autre plante de la famille des *Euphorbiaceae* (Ito et al., 1981). Ces substances potentialisent le pouvoir transformant d'EBV sur les cellules B (Mizuno et al., 1983) et induisent la réactivation d'EBV dans les cellules B infectées (Ito et al., 1981; Mannucci et al., 2012a; Mizuno et al., 1986). Elles sont également capable de moduler l'immunité cellulaire T spécifique anti-EBV (Imai et al., 1994; Mizuno et al., 1983) et même d'induire des réarrangements chromosomiques *in vitro* et *in vivo* (Aya et al., 1991; Imai et al., 1994; Steel et al., 1985). Ces réarrangements chromosomiques impliquent assez souvent le chromosome 8 avec activation de l'oncogène *MYC* (Aya et al., 1991; Mannucci et al., 2012a). *E. tirucalli* apparait ainsi comme un cofacteur du virus EBV dans la pathogenèse du LBe

⇒ **Aflatoxine B1 (AFB1)**

Il s'agit d'une mycotoxine produite par des champignons du genre *Aspergillus* qui sont très répandus en Afrique subsaharienne (Xu et al., 2018). L'AFB1 contamine une grande variété de produits agricoles mal conservés tels que le blé, l'arachide, le maïs, le riz... qui sont souvent la base du régime alimentaire dans ces zones géographiques. De plus, une exposition très précoce dès la période in utéro est possible (Hernandez-Vargas et al., 2015; Lauer et al., 2019; Passarelli et al., 2020; Turner et al., 2007). AFB1 est surtout connu pour son association avec le cancer primitif du foie (IARC, 2002) et a été reconnu comme un carcinogène humain du Groupe I par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC/IARC). Son rôle dans l'apparition d'autres cancers (poumon, tube digestif, sein, vésicule biliaire, peau...) a également fait l'objet de diverses études (Marchese et al., 2018) mais il n'existe pas encore de preuves formelles de son implication dans les hémopathies malignes en général et dans le LB en particulier. Cependant, une étude intéressante menée par Accardi et ses collaborateurs a démontré *in vitro* et sur des modèles

animaux l'aptitude de l'AFB1 à réactiver le cycle lytique d'EBV et la coopération entre AFB1 et EBV dans la transformation des lymphocytes B (Accardi et al., 2015). De plus, des motifs spécifiques de méthylation de l'ADN identifiés dans des lignées cellulaires de LB EBV-positives ont également été retrouvés dans l'ADN extrait du sang de nourrissons gambiens avec une forte exposition *in utero* à l'AFB1 (Hernandez-Vargas et al., 2015). Ces données supportent la possibilité de l'implication de l'AFB1 dans le développement du LBe en tant que cofacteur du virus EBV, au même titre que *P. falciparum* et *E. tirucalli*. En plus, un effet oncogène direct de l'AFB1 sur les cellules B, indépendamment d'EBV, pourrait également être envisagé. En effet, l'AFB1 induit un stress oxydatif et a des propriétés génotoxiques, mutagéniques et immunosuppressives (Accardi et al., 2015; Engin and Engin, 2019; Marchese et al., 2018; Preisler, 2000; Rushing and Selim, 2019). Il interagit avec l'ADN avec lequel il forme des adduits via un de ses métabolites. Ces adduits Aflatoxine-ADN ont été retrouvés dans beaucoup de tissus humains, y compris les cellules hématopoïétiques et sont impliqués dans les mécanismes carcinogéniques imputés à l'aflatoxine (Engin and Engin, 2019). Il a aussi été démontré que l'AFB1 peut fortement induire une recombinaison mitotique dans des lignées cellulaires lymphomateuses murines (Preisler, 2000) et lymphoblastoïdes humaines (International Agency for Research on Cancer, 2012). Ces recombinaisons mitotiques pourraient favoriser la formation de translocations chromosomiques. Des études supplémentaires en particulier épidémiologiques sont nécessaires pour mieux asseoir le lien entre AFB1 et LBe.

⇒ **Autres**

D'autres facteurs étiologiques tels que la malnutrition (Sumba et al., 2010) ou également les arbovirus en particulier le Chikungunya (van den Bosch and Lloyd, 2000) pourraient contribuer à augmenter le risque de développer un LBe. L'existence d'autres facteurs de risque n'est pas à exclure, notamment pour les LB sporadiques survenant en dehors de la ceinture africaine du lymphome et non associés aux virus EBV, VIH et leurs potentiels cofacteurs.

En résumé de ce chapitre 5, nous pouvons retenir que le LB est caractérisé, quelle que soit la variante clinique (endémique, sporadique et associée au VIH) par une translocation chromosomique impliquant toujours l'oncogène *MYC* et un gène des chaînes d'Ig avec comme conséquence une surexpression de *MYC*. La plus fréquente de ces translocations est la t(8;14) entre *MYC* et *IGH*. Cependant, les points de cassures chromosomiques varient en fonction de la

forme clinique, suggérant des mécanismes différents. Sur le plan étiologique, le LB est associé à divers facteurs variables en fonction de la forme clinique et de la région géographique. La forme endémique Africaine est constamment associée au virus EBV qui collabore avec le parasite *P. falciparum*, la plante *E. tirucalli* et potentiellement la mycotoxine AFB1. La forme sporadique est rarement associée à EBV, sans autres facteur de risque spécifique mis en évidence. La forme associée au VIH peut être associée à EBV dans près de la moitié des cas. Le rôle de ces facteurs étiologiques dans la formation la translocation demeurent cependant flou. Le mécanisme le plus reconnu est l'induction d'une surexpression de l'enzyme AID, une enzyme clé dans la formation de cette translocation. Cependant, ce rôle d'AID s'intègre probablement dans un contexte multifactoriel faisant intervenir d'autres conditions comme la proximité spatiale de *MYC* et *IGH* pour aboutir à la formation de la translocation t(8 ;14).

Cette revue de la littérature, nous a permis de mesurer le potentiel oncogénique des virus EBV et VIH et leur implication dans la pathogenèse du Lymphome de Burkitt. Il ressort cependant peu de données sur leur rôle direct dans la formation de la translocation t(8 ;14) qui caractérise 80% de ces lymphomes de Burkitt. L'abord de l'organisation nucléaire des cellules ainsi que des mécanismes de formation des translocations chromosomiques a permis d'orienter nos questions de recherche, d'émettre des hypothèses et de dégager des objectifs pour l'étude du rôle joué par ces virus dans la formation de cette translocation.

Question de recherche, hypothèses
et objectifs

Au terme de cette première partie, il apparaît légitime de se poser une question : les virus EBV et VIH jouent-ils un rôle direct dans la formation de la translocation t(8 ;14) ? Le cas échéant, quel(s) serai(en)t les mécanismes impliqués ?

Il est admis que 3 conditions sont nécessaires pour qu'une translocation chromosomique puisse se produire : i. des cassures double brin d'ADN simultanées sur les chromosomes partenaires de translocation ; ii. une réparation de ces cassures par une recombinaison non-homologue ; iii. une proximité spatiale des deux loci impliqués dans la translocation chromosomique (Roix et al., 2003). Sachant que les loci *MYC* et *IGH* impliqués dans cette translocation sont normalement situés dans des compartiments différents dans les noyaux des lymphocytes B, notre principale hypothèse est que ces virus, directement ou par l'intermédiaire de certaines protéines virales, perturbent l'architecture nucléaire des cellules B favorisant la proximité spatiale (colocalisation) des loci *MYC* et *IGH*. Ces virus pourraient également favoriser la survenue de cassures doubles brins simultanées sur *MYC* et *IGH*, condition nécessaire à leur translocation. Pour cette deuxième hypothèse, nous nous sommes surtout focalisés sur l'enzyme AID d'une part du fait des cassures doubles brins d'ADN qu'il induit physiologiquement sur *IGH* au cours de la maturation des lymphocytes B ; d'autre part, du fait de son implication reconnue dans la survenue de la translocation *MYC-IGH* (Ramiro et al., 2004).

Ainsi, le premier objectif de ce travail était d'étudier le rôle du virus EBV, dans sa forme latente et/ou lytique, dans l'induction de la proximité entre *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B et les ainsi que les conséquences de cette proximité sur leur taux de translocation. Le rôle du VIH-1 dans l'induction de la proximité *MYC-IGH* ayant déjà été établi par une étude antérieure de l'équipe (Germini et al., 2017), notre deuxième objectif était alors d'investiguer l'implication du VIH dans les cassures doubles brins d'ADN spécifiques sur *MYC* et *IGH* potentiellement induites par l'AID.

Méthodologie

Méthodologie

1.	Modèles cellulaires et culture	150
1.1.	Lymphocytes B	150
1.2.	Lignées cellulaires lymphoblastoïde (LCLs)	152
1.3.	Modèles expérimentaux LCLs RPMI 8866 génétiquement modifiées	153
1.4.	Lignée cellulaire Jurkat	155
2.	Traitement des cellules	155
3.	Western Blot	156
4.	Extraction d'ARN et Quantitative RT-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)	158
5.	Extraction d'ADN et Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)	159
6.	Hybridation in situ par Fluorescence (FISH)	160
6.1.	3D-FISH	160
6.2.	Immuno-3D FISH	163
6.3.	FISH en suspension	163
7.	Acquisition et analyse des images après la FISH	164
8.	Cytométrie en flux (FACS)	164
9.	Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP) sur ChIP	165
10.	Patients	165
10.1.	Considérations éthiques	165
10.2.	Recrutement des patients et prélèvements sanguins	165
10.3.	Sérologie EBV et classification des enfants en fonction du profil sérologique	167
11.	Analyses statistiques	169

1. Modèles cellulaires et culture

1.1. Lymphocytes B

Des anneaux de cytophérèse obtenus à partir de donneurs sains ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang conformément à la législation nationale française. Les lymphocytes B ont été isolés par sélection négative après purification des PBMC selon le protocole décrit ci-dessous.

⇒ **Purification des PBMC :**

Les cellules mononucléées peuvent être séparées des autres composantes du sang par leur densité en utilisant la méthode du « Ficoll-Hypaque ». Le Ficoll est un polysaccharide hydrophile de densité 1,077g/l qui permet de séparer les éléments figurés du sang par centrifugation en gradient de densité. Le protocole suivant a été réalisé :

- Distribuer 10-12 ml de Ficoll dans un tube Falcon de 50ml.
- Déposer délicatement jusqu'à 30ml de sang total dilué dans un volume égal de Phosphate Buffer Saline (PBS) 1X stérile sur la couche de Ficoll-Hypaque en faisant attention de ne pas les mélanger.
- Centrifuger à 2200 tours/mn pendant 20mn à température ambiante (TA) avec une faible accélération et sans frein. Après centrifugation, les cellules de densité moyenne, les PBMC, flottent au-dessus du Ficoll alors que les globules rouges et les granulocytes, de densité plus élevée, forment un culot au fond du tube. Le plasma et les plaquettes ayant une densité plus faible forment une couche au-dessus des PBMC (Figure 25).
- Les cellules mononucléées peuvent ensuite être récupérées à l'aide d'une pipette et lavées 3 fois avec du PBS stérile afin d'éliminer les traces de Ficoll.

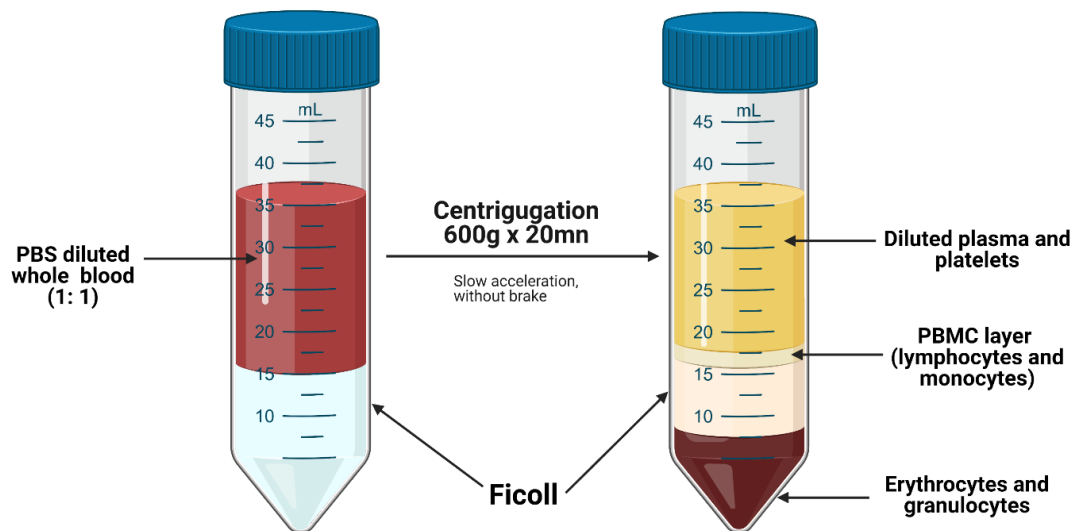


Figure 25: Séparation des PBMC par gradient de centrifugation au Ficoll

⇒ **Isolation des lymphocytes B**

- Pour faire adhérer les monocytes et enrichir les lymphocytes non adhérents, les PBMC ont été resuspendus dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% de pénicilline/streptomycine puis incubés toute la nuit à 37°C en présence de 5% de dioxyde de carbone (CO₂) dans des flasques de culture cellulaire. Pour une utilisation immédiate, la durée d'incubation peut être raccourcie à 20mn en utilisant du RPMI 1640 supplémenté avec 20% de SVF au lieu de 10%.
- Le lendemain, les PBMC n'ayant pas adhérents à la flasque ont été recueillis après centrifugation et élimination du surnageant. Les lymphocytes B ont été ensuite purifiés par sélection négative grâce à une technique de séparation immuno-magnétique avec le kit d'isolement des cellules B II de Macs Milteny Biotec (Bergisch-Gladbach, Allemagne). Pour ce faire, les cellules ont d'abord été incubées avec un cocktail d'anticorps biotinylés (CD2, CD14, CD16, CD36, CD43, et CD235a (glycophorine A)) permettant de marquer toutes les cellules non-B (lymphocytes T et NK et d'éventuels monocytes, granulocytes, plaquettes et globules rouges résiduels). Les cellules sont ensuite incubées avec des microbilles anti-biotine puis placées dans un champ magnétique. Les cellules B pures peuvent ensuite être recueillies après déplétion magnétique de toutes les cellules non-B (Figure 26). Elles sont ensuite lavées avec du PBS puis laissées au repos toute la nuit, en suspension dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) et 1% de

pénicilline/streptomycine à 37°C en présence de 5% de CO₂ avant d'être fixées sur des lamelles pour une FISH (voire chapitre 6)

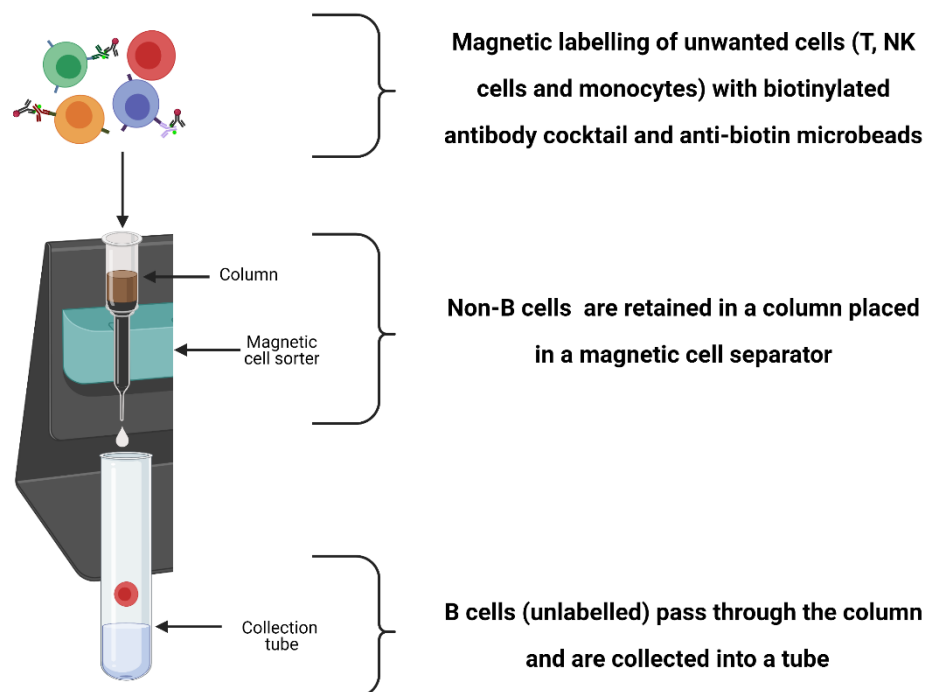


Figure 26: Isolation des cellules B par sélection négative par séparation immuno-magnétique

1.2. Lignées cellulaires lymphoblastoïde (LCLs)

Les LCLs sont obtenues par immortalisation *in vitro* de lymphocytes B normaux via une infection par le virus EBV. Les cellules ainsi obtenues contiennent le génome du virus en phase de latence. Nous avons travaillé avec des LCLs RPMI8866 et PRIESS, ainsi que des LCLs M81 et B048 (gentiment offertes par Pr Henry Jacques Delecluse) obtenus à partir de souches virales capables de se réactiver en dehors de toute stimulation (Delecluse et al., 2020; Tsai et al., 2013). Toutes les LCLs ont été cultivées dans du RPMI1640 supplémenté en L-glutamine (2mM), pyruvate de sodium (1mM), glucose (2%), pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100µg/ml) et SVF 10%. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO₂ et saturée en eau.

1.3. Modèles expérimentaux LCLs RPMI 8866 génétiquement modifiées

Dans les cellules normales, il peut y avoir une formation accidentelle de translocations chromosomiques mais elles ne sont pas détectables par les techniques habituelles. La faible fréquence de ces translocations ($1/10^7$ cellules) fait de la FISH une technique peu sensible et la variabilité des points de cassure chromosomique ne permet pas l'utilisation de la PCR qui nécessite de connaître les points de cassure pour le choix de la séquence des amorces. Ainsi, afin de pouvoir étudier *in vitro* la translocation t(8 ;14) entre *MYC* et *IGH* et les facteurs pouvant influencer sa formation, nous avons développé un modèle cellulaire expérimental en s'aidant de la technologie Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) /Cas9 et du système de lignée cellulaire Tet-ON. Brièvement, en utilisant le protocole décrit par (Canoy et al., 2020), les LCLs RPMI8866 ont été génétiquement modifiés par co-transfection de deux plasmides et deux TALENS. Le premier plasmide code pour la nucléase Cas9 et deux ARN guides (ARNg) ciblant spécifiquement *MYC* et *IGH* en des endroits bien déterminés et dont l'expression est sous le contrôle d'un promoteur sensible à la Tétracycline ou la doxycycline, un de ses dérivés (Figure 27A). Les séquences des ARNg utilisés sont listées dans le tableau VII. Le deuxième plasmide contient le gène de résistance à la néomycine et le gène codant pour la protéine transactivatrice inverse de la tétracycline (Figure 27A). Cette dernière, en présence de doxycycline, va activer le promoteur des séquences codant pour la Cas9 et les deux ARNg. Les deux TALENS vont introduire des cassures doubles brins au niveau de régions dites « safe-harbor » où les plasmides seront intégrés (Figure 27B). Les cellules stablement transfectées ont été ensuite sélectionnées avec la puromycine et la néomycine. Ainsi, en présence de Doxycycline, la Cas9 est exprimée et va induire des CDBs sur les loci *MYC* et *IGH*, guidée par les ARNg respectifs également exprimés en réponse à la Doxycycline. Dans la suite de ce travail, cette lignée sera désignée par *MYCIGHC9*. Suivant la même procédure que pour la lignée *MYCIGHC9*, nous avons également développé 3 autres lignées cellulaires qui expriment de façon inducible la Cas9 associé à un ARNg ciblant uniquement *MYC* (lignée *MYCC9*) ; un ARNg ciblant uniquement *IGH* (lignée *IGHC9*) ou deux ARNg ciblant *AML (RUNX1)* et *ETO (RUNX1T1)* (lignée *AMLETOC9*). Ces lignées ont été utilisées pour étudier la position des loci *MYC* et *IGH* en cas de CDBs spécifiques sur l'un et/ou l'autre des loci. Toutes ces lignées ont été mises en culture dans les mêmes conditions que les LCLs normaux en remplaçant le SVF par un sérum dépourvu de

Tétracycline (Tet-free serum) et en ajoutant un antibiotique le G418, un analogue de la néomycine pour la sélection des cellules.

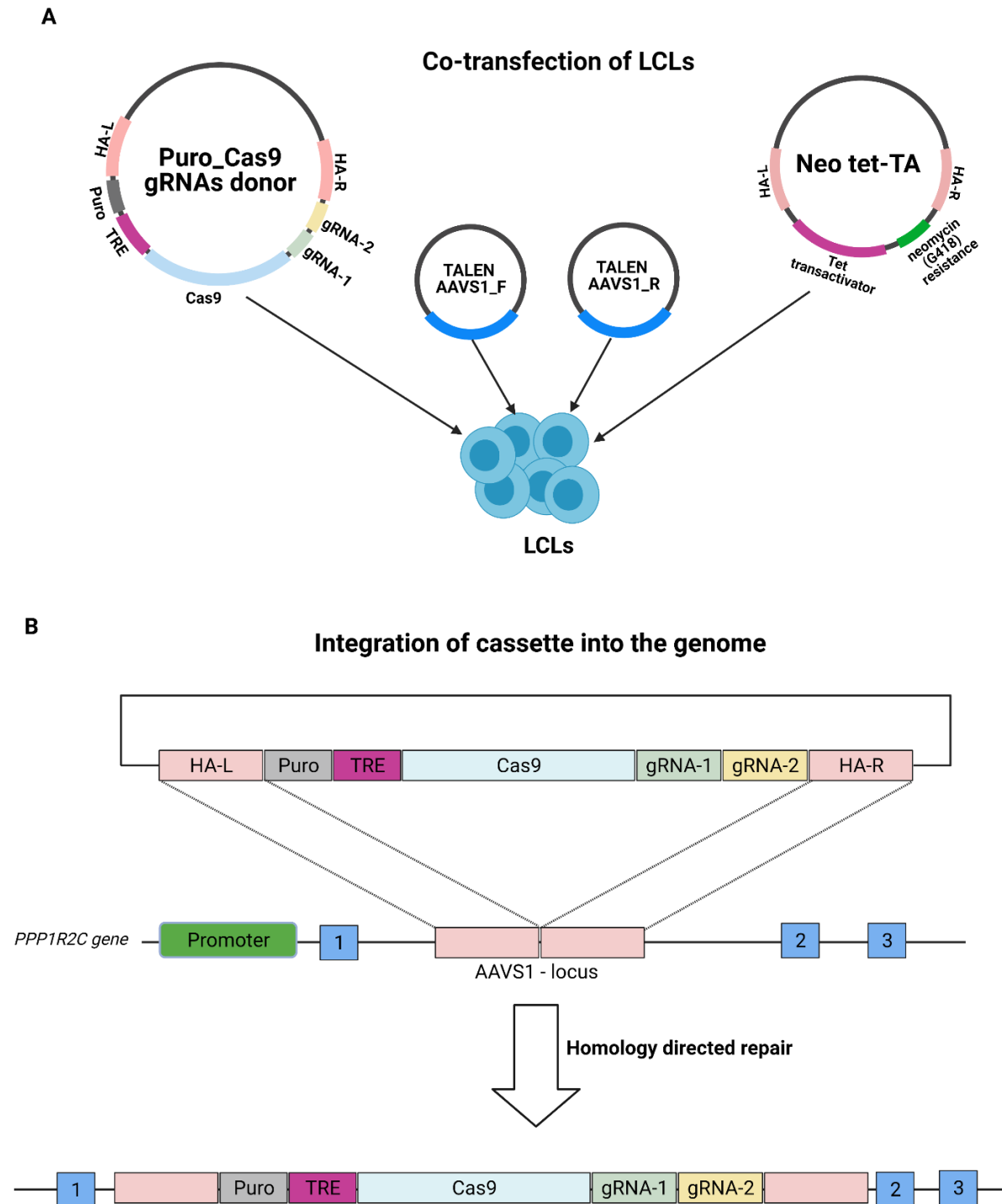


Figure 27: Modèle expérimental de création des lignées cellulaires stables en utilisant la technologie CRISPR/Cas9

Puro = Gène de résistance à la puromycine ; TRE = Tetracycline Responsive Element ; HA-L (R) = Homology arm left (right) ; gRNA = ARN guide ; AAVS1 = adeno-associated virus integration site 1 ; TALEN = Transcription activator like effector nuclease

Tableau VII: Séquences des ARN guides utilisés pour la création des lignées cellulaires

Gène cible	Séquence 5' -> 3'
<i>AML</i>	GACTCCCCCATGTACCCCTA
<i>ETO</i>	GATGTAAGAGGAAGCAGCTT
<i>IGH</i>	GAGAACATACCAAGCCCCAC
<i>MYC</i>	TGCACCTCGGACGCTCCTGC

1.4. Lignée cellulaire Jurkat

Les cellules Jurkat sont une lignée cellulaire immortalisée de lymphocytes T humains isolés à partir du sang d'un enfant atteint de leucémie aigüe lymphoblastique T. Les cellules Jurkat sont EBV négatives et ont été utilisées comme contrôle négatif dans quelques expériences. Leur culture s'est effectuée dans du RPMI1640 supplémenté en L-glutamine (2mM), pyruvate de sodium (1Mm), glucose (2%), pénicilline (100 U/ml), streptomycine (100µg/ml), HEPES (10mM) et SVF 10%. Les cellules ont été incubées à 37°C dans une atmosphère comportant 5% de CO₂ et saturée en eau.

2. Traitement des cellules

Les cellules ont été traitées ou pas avec différentes substances selon les objectifs de l'expérience avant de procéder aux techniques décrites ci-dessus. Le tableau VIII représente les différents produits utilisés pour le traitement des cellules ainsi que leurs propriétés et les concentrations utilisées.

Tableau VIII: Caractéristiques des substances utilisées pour le traitement des cellules

Produits <i>(Fonction)</i>	Propriétés	Concentrations de travail
Protéine recombinante Zebra du virus EBV	Réactivation du cycle lytique du virus EBV dans les LCLs	1µg/ml
Trichostatine A (TSA) <i>Inhibiteur HDAC</i>		6,6µM
Sodium Butyrate (NaB) <i>Inhibiteur HDAC</i>		2,5µM
Abexinostat (S78) <i>Inhibiteur HDAC</i>		100nM
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)		8nM
Doxycycline <i>Antibiotique</i>	Activation de la transcription de la Cas9 et des ARNg	1µg/ml
Actinomycine D <i>Inhibiteur ARN polymérase II</i>	Inhibition de la transcription de l'ADN	0,2µg/ml
Mirin <i>Inhibiteur de MRE11</i>	Inhibition de la réparation l'ADN	25µM
NU 7026 <i>Inhibiteur de la DNA-PK</i>	Inhibition de la voie classique de la réparation non homologue de l'ADN	20µM
L67 <i>Inhibiteur des ligases I et III</i>	Inhibition de la voie alternative de la réparation non homologue de l'ADN	25µM
B02 <i>Inhibiteur de RAD51</i>	Inhibition de la réparation homologue de l'ADN	6,25µM
Protéine Tat purifiée du VIH1	Facteur de transcription du VIH1	250ng/ml
Cocktail <i>IL4 humain</i> <i>Anti-CD40 humain</i> <i>Anti-IgM humain</i>	Activation des lymphocytes B	10ng/ml 1µg/ml 20µg/ml

3. Western Blot

Les LCLs RPMI8866 ou PRIESS traitées ou non avec des inducteurs du cycle lytique d'EBV pendant 24h ou les LCLs de la lignée *MYCIGHC9* traitées ou non avec de la doxycycline pour différentes durées ont été collectées puis centrifugées à 1200 tours/mn pendant 10mn à TA. Après élimination du surnageant, le western blot a été réalisé selon le protocole suivant :

⇒ **Extraction des protéines**

- Laver le culot 1 fois avec du PBS 1X, éliminer le surnageant, resuspendre dans 150µl de tampon NETN (150mM NaCl + 1mM EDTA + 50mM Tris pH 7,5 + 0,5% NP-40 + 1% d'inhibiteur des protéases) et bien mélanger à l'aide d'un vortex
- Incuber le mélange 30mn dans de la glace puis faire une sonication pendant 10-15secondes à 30% d'intensité.
- Centrifuger à 12000 tours/mn pendant 10mn à +4°C et recueillir le surnageant qui contient les extraits protéiques en évitant de toucher le fond du tube. Mettre de côté 5µl pour la quantification. Les échantillons peuvent être conservés à ce stade à -80°C ou après l'étape de dénaturation (voir ci-dessous).

⇒ **Quantification des protéines avec le kit de dosage des protéines Pierce BCA**

(Thermo Scientific) selon les instructions du fabricant. L'absorbance de la réaction a été mesurée à 562nm avec le Nanodrop puis les concentrations correspondantes déterminées à l'aide d'une courbe standard.

⇒ **Dénaturation des protéines**

- Préparer le mélange de protéine (mettre la même quantité de protéine pour tous les échantillons). Pour 20µl de mélange, mettre
 - 5µl de tampon LDS 4X
 - 1µl de DTT (dithiothréitol)
 - Volume d'échantillon correspondant à la quantité de protéine souhaitée
 - Compléter avec du tampon NETN jusqu'à 20µl
- Incuber le mélange pendant 10mn à 90°C et faire une centrifugation rapide pour faire descendre toutes les gouttelettes qui sont au niveau des parois du tube. Les échantillons sont prêts pour être déposer dans le gel ou peuvent être conservés à -80°C.

⇒ **Migration – Transfert – Saturation et Incubation avec l'anticorps primaire**

- Déposer 12 à 18µl (selon la taille des puits) de protéines dénaturées dans les puits de gel préfabriqué 4-12% SDS-PAGE (Invitrogen) et faire migrer dans du tampon MOPS (3-(N-morpholino) propane sulfonic acid) à 80V pendant 30mn puis 120V pendant 60-90mn à TA
- Transférer les protéines migrées sur une membrane PVDF (PolyVinylidene Fluoride) (GE Healthcare, USA) dans du tampon de transfert (Trisglycine 1X + 20% éthanol) à 90V pendant 2h à +4°C.

- Saturer la membrane par incubation dans 5% de lait dilué dans du TBST (Tris Buffer Saline + 0,1% Tween20) pendant 1h à température ambiante.
- Après 3 lavages avec du TBST, incuber la partie de la membrane comportant la protéine d'intérêt avec l'anticorps primaire dilué dans 5% d'albumine de sérum bovin (BSA) toute la nuit à +4°C. Les anticorps primaires de souris anti-Cas 9 (Santa Cruz ; dilution 1 :200) et anti-Zebra (cadeau du Dr Emmanuel Drouet, Université Grenoble Alpes ; dilution 1 :1000) ont été utilisés pour nos protéines d'intérêt. Les anticorps primaires de souris anti-beta actine (Santa Cruz ; dilution 1 :1000) ou de lapin anti-alpha tubuline (Santa Cruz ; dilution 1 :1000) ont été utilisés pour nos protéines contrôles.

⇒ ***Incubation avec l'anticorps secondaire et révélation***

- Le lendemain, laver la membrane 3 fois avec du TBST et incuber avec un anticorps secondaire conjugué à l'HRP (Invitrogen ; dilution 1 :2500) dilué dans 5% de lait pendant 1h à TA.
- Après 3 lavages au TBST, incuber la membrane avec le réactif Immobilon® Western Chemiluminescence HRP substrate (Merck-Millipore, USA) selon les instructions du fabricant.
- L'exposition et la révélation ont été effectuée avec l'appareil ImageQuant Las 4000 mini (GE Healthcare).

⇒ ***Quantification des bandes de western blot :***

A été réalisée avec le logiciel ImageJ. L'intensité des bandes de la protéine d'intérêt a toujours été normalisée avec celle de la protéine contrôle. Les résultats sont exprimés en fold-change, l'intensité de la bande correspondante aux contrôles négatifs étant considérée comme égale à 1.

4. Extraction d'ARN et Quantitative RT-Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

Les cellules en suspension (LCLs RPMI8866 traitées ou pas avec des inducteurs du cycle lytique, LCLs M81 et LCLs B048) ou les cellules B purifiées ont été collectées puis centrifugées à 1200 tours/mn pendant 10mn à TA. Après élimination du surnageant, les ARN totaux ont été extraits avec le Kit de purification Nucleospin® RNA II (Machery-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La quantification de l'ARN s'est faite par avec le Nanodrop (Thermo Scientific). Pour chaque expérience, la même quantité d'ARN a été rétro-transcrite en ADN complémentaire pour tous les échantillons, en utilisant le RevertAid RT Reverse Transcription Kit (Thermo Scientific) selon le protocole du fabricant. L'amplification par qPCR de l'ADN a été effectuée en utilisant le

PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) selon le programme suivant : 1 cycle de 50°C (2mn) + 95°C (2mn) ; 40 cycles de 95°C (15s) + 60°C (1mn) + 72°C (1mn) and 1 cycle de 72°C (10mn). Les séquences des amorces utilisées dans les différentes expériences sont listées dans le tableau IX. L'expression relative des gènes a été évaluée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ après normalisation par le *GAPDH*. Selon les expériences, l'expression d'un ou de plusieurs gènes du cycle lytique d'EBV (*BZLF1*, *BRLF1*, *BDRF1*, *BLLF1*), de *MRE11* ou d'*AICDA* dans les LCLs RPMI8866 ou les cellules B non traitées a été comparée à celle des RPMI8866 ou cellules B traitées ou des LCLs M81 ou B048. Le niveau d'expression des cellules contrôles était toujours fixé à 1.

5. Extraction d'ADN et Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Les cellules de la lignée *MYCIGHC9*, traitées ou pas avec la doxycycline, associée ou non à la protéine recombinante Zebra ou au NaB pendant une durée déterminée, ont été collectées et centrifugées à 1200 tours/mn pendant 10mn à TA. Après élimination du surnageant, l'ADN total a été extrait avec le Kit de purification Nucleospin® Tissue DNA (Machery-Nagel) en suivant les instructions du fabricant. La quantification de l'ADN s'est faite avec le Nanodrop (Thermo Scientific). Cinq-cents nanogrammes d'ADN génomique ont été amplifiés pour tous les échantillons, en utilisant le PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) selon le programme suivant : 1 cycle de 50°C (2mn) + 95°C (2mn) ; 40 cycles de 95°C (15s) + 60°C (1mn) + 72°C (1mn) and 1 cycle de 72°C (10mn). Des amorces *MYC* et *IGH* complémentaires à des séquences non loin des points de cassures ont été utilisées pour la détection de la translocation *MYC-IGH*. Le gène *MYC* a été utilisé comme contrôle en utilisant des amorces de *MYC* complémentaires à des séquences situées loin des zones de cassures (~6,5kb). Les séquences des amorces utilisées dans les différentes expériences sont listées dans le tableau IX. Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 1% pour la visualisation des amplicons après migration par électrophorèse. Pour la qPCR, la quantification des niveaux de translocation a été effectuée par la méthode des $2^{-\Delta\Delta C_t}$ après normalisation par *MYC*. Le niveau de translocation des cellules contrôles (cellules non traitées par la doxycycline ou traitées par la doxycycline selon les expériences) a été fixé à 1.

Tableau IX: Liste de la séquence des amorces utilisés pour la PCR et la RT-PCR

Gènes cible	Séquence 5' -> 3'	Température d'Annealing (°C)
<i>MYC</i> (pour détecter la translocation)	AGGAGGTGGCTGGAACTTGT	60
<i>IGH</i> (pour détecter la translocation)	TCCCCTCCCTTCTGAGTCTGC	
<i>MYC F</i> (~6.5 kb en aval du point de cassure)	AAGGTCAGAGTCTGGATCAC	
<i>MYC R</i> (~6.5 kb en aval du point de cassure)	TAACTACCTGGGGGCCTTT	
<i>BZLF1</i> -b F	AAATTTAAGAGATCCTCGTGTAACATC	
<i>BZLF1</i> -b R	CGCCTCCTGTTGAAGCAGAT	
<i>BRLF1</i> -b F	CAAACAGACGCAGATGAGGC	
<i>BRLF1</i> -b R	GCGGTGCCTGGTGGCAGG	
<i>BDRF1 F</i>	CGGAGTGGCTCAGTCTAAGG	
<i>BDRF1 R</i>	AGGTGGGCTGACACAGACTT	
<i>BLLF1 F</i>	AGAATCTGGGCTGGGACGTT	
<i>BLLF1 R</i>	ACATGGAGCCCGGACAAGT	
<i>MRE11 F</i>	CCAGAGAAGCCTCTTGTACG	
<i>MRE11 R</i>	TTCCACCTCTTCGACCTCTTC	
<i>AICDA F</i>	TCTTGATGAACCGGAGGAAG	
<i>AICDA R</i>	AGCCGTTCTTATTGCGAAGA	
<i>GAPDH F</i>	CTGCACCACCAACTGCTTAG	
<i>GAPDH R</i>	AGGTCCACCACTGACACGTT	

6. Hybridation in situ par Fluorescence (FISH)

6.1. 3D-FISH

Il s'agit d'une technique d'hybridation in situ qui permet de maintenir la structure tridimensionnelle du noyau. Elle a été utilisée pour étudier la position des loci *MYC*, *IGH* et *CCND1* et la distance qui les sépare dans l'espace nucléaire des cellules. Le marquage des loci 8q24 (gène *MYC*), 14q32 (gène *IGH*) et 11q13 (gène *CCND1*) a été effectué avec les sondes "RainbowFISH" (Empire Genomics, Buffalo, NY, USA). Le protocole décrit ci-dessous a été utilisé et se résume en 6 étapes :

⇒ **1^{ère} étape : Préparation des lamelles 15 x 15mm couvertes de polylysine**

- Déposer une goutte de colle transparente (Fixogum Ciment) au centre d'une des faces de la lamelle et laisser sécher puis marquer le coin supérieur gauche ou inférieur droit de la lamelle avec un petit trait horizontal au crayon.
- Retourner la lamelle sur l'autre face et la déposer dans un puit d'une plaque à 6 puits (face contenant la colle en bas, marque de crayon en haut à droite ou en bas à gauche). Cette marque au crayon permet de pouvoir différencier la face de la lamelle où il y a la colle de celle où les cellules ont été déposées.
- Déposer 20µl de polylysine au centre de la lamelle déposée dans le puit et recouvrir par une deuxième lamelle (face contenant la colle en haut) pendant 15 à 20mn à TA.
- Ajouter 1ml d'eau pour détacher les lamelles et placer chacune dans un puit (toujours colle en bas et marque de crayon en haut à droite ou en bas à gauche) et laisser sécher à l'air libre ou dans l'incubateur à 37°C. Une fois sec, les lamelles peuvent ainsi être conservé au réfrigérateur à +4°C pendant longtemps.

⇒ **2^{ème} étape : Collecte et dépôt des cellules sur les lamelles polylysines**

- Compter les cellules en suspension et collecter la quantité correspondante au nombre de lamelles nécessaires (environ 500000 cellules par lamelles sont suffisantes). Centrifuger les cellules collectées à 1200 tours/mn pendant 10mn, éliminer le surnageant et resuspendre le culot dans 70µl de RPMI sans SVF x (nombre de lamelles prévus par échantillon).
- Déposer 70µl de cellules en suspension au centre de chaque lamelle et incubé pendant 15 à 30 mn à 37°C avec 5% de CO₂.

⇒ **3^{ème} étape : Fixation des cellules**

- Ajouter du PBS 0,3X dans chaque puit pour laver et éliminer les cellules non attachées à la lamelle. Aspirer le liquide surnageant.
- Ajouter de la Paraformaldéhyde (PFA) 4% diluée dans du PBS 0,3X et laisser incubé 10mn à TA.
- Aspirer le PFA et laver 3 x 5mn dans du PBS 1X. A ce stade les lamelles peuvent être conservées dans du PBS 1X à +4°C ou bien on peut passer à l'étape suivante.

⇒ **4^{ème} étape : Traitement post fixation**

- Aspirer le PBS et incubé avec 2% de Triton X-100 pendant 10mn à température ambiante.

- Aspirer le Triton et incuber dans 2ml de Glycérol 20% dilué dans du PBS 1X, soit pendant 1h à TA, soit pendant toute la nuit à +4°C.
- Procéder à une congélation / décongélation de la lamelle dans de l'azote liquide : en tenant la lamelle avec une pince, la plonger successivement dans 20% de glycérol puis dans l'azote liquide. Laisser l'azote liquide s'évaporer puis recommencer 2 à 3 fois.
- Laver 3 fois en PBS 1 X puis incuber dans une solution d'acide chlorhydrique (HCl) 0,1M pendant 20mn à TA
- Laver 2 fois avec une solution de citrate de sodium saline (SSC) 2X puis incuber les lamelles avec de la RNase A à 200µg/l dans du SSC 2X en chambre humide à 37°C pendant 1h.
- Laver à nouveau 3 x 5mn avec du SSC 2X avant d'équilibrer avec la formamide 50% diluée dans du SSC 2X soit pendant 2h à TA, soit toute la nuit à 4°C. Les cellules peuvent être conservée en formamide 50% jusqu'à 6mois à +4°C.

⇒ **5^{ème} étape : Hybridation**

- Utiliser une lame en verre 2 x 5 cm comme support (nettoyer la lame avec de l'éthanol 70% au besoin). Mettre sur la lame 50µl de formamide 70% (dilué dans du SSC 2X) et déposer la lamelle dessus (face contenant les cellules en bas en contact avec la formamide et colle en haut).
- Préparer les sondes dans l'obscurité : mettre dans un tube eppendorf 1,5 ml, 10µl de tampon d'hybridation et 0,5 à 1µl de chaque sonde (*MYC* et *IGH* ou *CCND1* et *IGH*)
- Chauffer la lame (avec la lamelle contenant les cellules dessus) et le tube eppendorf contenant les sondes à 75-80°C pendant 5mn avec une plaque chauffante.
- Mettre la lame et le tube eppendorf dans de la glace. Prendre une autre lame en verre (comme support) : retourner une lamelle et la déposer sur la lame de support cellule en haut ; ajouter 10µl du mélange tampon d'hybridation + sondes et recouvrir avec une deuxième lamelle, cellules en bas (ou une lamelle vide s'il n'y a qu'une seule lame à hybrider). Fermer les bords des lamelles avec de la colle et mettre la lame en chambre humide dans l'obscurité à 37°C pendant 48-72h.

⇒ **6^{ème} étape : Lavage et montage sur lame**

- Enlever la colle et mettre chaque lamelle dans un puits dans 50% de formamide et incuber à 37°C pendant 5mn.

- Laver successivement 2 x 5mn dans du SSC 2X et 3 x 5mn dans du PBS 1X à TA
- Mettre une goutte de Vectashield (ou un autre milieu de montage) contenant du DAPI (DiAmidino Phenyl Indol) sur une lame et déposer la lamelle dessus, cellules en bas et fermer les bords avec du vernis à ongle pour éviter l'entrée d'air. Les cellules sont ainsi prêtes pour être observées au microscope.

6.2. Immuno-3D FISH

Elle associe la 3D-FISH ci-dessus décrite et un marquage par immunofluorescence. Dans ce travail, l'immuno-3DFISH a été réalisée soit pour le marquage de la forme phosphorylée de l'histone H2AX (γ H2AX) dans le but d'évaluer la présence de dommages d'ADN dans les cellules spécifiquement sur un loci donné *MYC* ou *IGH*; soit pour le marquage de la protéine MRE11 pour détecter la réparation pour détecter les centres de réparation de l'ADN. Les étapes suivantes sont rajoutées au protocole de 3D-FISH avant le montage des cellules sur lame dans du Vectashield :

- Incuber les lamelles dans 0,5% BSA dilué dans du PBS 1X pendant 40mn à TA
- Laver 2 fois dans du PBS 1X puis incuber avec l'anticorps primaire de lapin anti-Histone H2AX phospho-Ser139 (Active Motif) ou anti-MRE11 (santa Cruz) dilution 1:500 dans du BSA 0,5% 2h à TA
- Laver 1 x 5mn avec 0,5% de BSA et 2 x 5mn avec du PBS 1X puis incuber avec l'anticorps secondaire Alexa 633 (Invitrogen), dilution 1:200 dans 0,5% de BSA pendant 1h à TA
- Laver 1 x 5mn avec 0,5% de BSA et 2 x 5mn avec du PBS 1X puis mettre une goutte de Vectashield (ou un autre milieu de montage) contenant du DAPI sur lame et déposer la lamelle dessus, cellules en bas. Fermer les bords avec du vernis à ongle pour éviter l'entrée d'air. Les cellules sont ainsi prêtes pour être observées au microscope

6.3. FISH en suspension

Il s'agit d'une technique qui combine une FISH suivie d'un tri cellulaire par cytométrie en flux selon la technique décrite par (Maguire et al., 2016). L'objectif était de réussir à trier les cellules B circulantes EBV-positives isolées à partir de prélèvement sanguin d'enfants vivant en zone d'endémie EBV (voir chapitre 10). Toutes les étapes de la FISH (fixation, perméabilisation, hybridation) ont été réalisées sur des cellules en suspension. Les cellules ont été hybridées avec

une sonde ciblant le génome EBV (BIO-PROBE® EBV, Enzo® Life Sciences cat# ENZ-40836). Les cellules positives ont été secondairement triées puis fixées sur lames pour l'étude de la colocalisation *MYC-IGH*. Pour la mise au point de la technique, nous avons utilisé un mélange de LCLs (EBV positive) et de cellules Jurkat (EBV négative), avec une majorité de cellules Jurkat pour se rapprocher le plus possibles des conditions chez les enfants.

7. Acquisition et analyse des images après la FISH

⇒ **Acquisition**

L'acquisition des images a été effectuée avec le Microscope Confocal Multiphoton SP8 (Leica Microsystems) avec un objectif 63X à immersion. Des coupes sont effectuées sur l'axe Z des cellules à chaque 0,5µm à partir d'une trame de 1024x1024mm avec un balayage multipiste séquentiel sur les longueurs d'ondes 405nm, 488nm, 543nm et 633nm respectivement pour les fluorescences du DAPI, vert, rouge et infrarouge.

⇒ **Analyse**

L'analyse des images pour l'étude de la colocalisation entre deux loci a été effectuée avec le logiciel Imaris (Bitplane). Deux loci étaient considérés comme colocalisés lorsque la distance qui les sépare était inférieure ou égale à 1µm. Le taux de colocalisation entre *MYC* et *IGH* correspondait ainsi au nombre de cellules contenant au moins un locus *MYC* situé à moins d'1µm d'un locus *IGH*, rapporté au nombre total de cellules observées.

L'analyse des images pour les colocalisations *MYC*/γH2AX, *IGH*/γH2AX, *IGH*/MRE11 ou *MYC*/*IGH*/MRE11 a été effectuée avec le logiciel Leica Application Suite X (Leica Microsystem).

8. Cytométrie en flux (FACS)

Les cellules B isolées à partir du sang de donneurs sains ont été traitées soit avec la protéine Tat soit avec le cocktail d'activation pendant 24 et 48h. Les cellules ont été ensuite collectées, lavées avec du PBS 1X, puis incubées avec un anticorps anti-CD23 (marqueur d'activation des cellules B) marqué à la Phycoérythrine (PE) et un anticorps anti-CD19 (marqueur spécifique des cellules B) marqué à la l'Isothiocyanate de Fluorescéine (FITC) pendant 20mn à +4°C. Les cellules ont été analysées avec le cytomètre LSR-II (BD, Biosciences, San Jose, CA) pour comparer le pourcentage de cellules B CD23+. Le but de cette expérience était de vérifier si la protéine Tat activait les cellules B.

9. Immunoprécipitation de Chromatine (ChIP) sur ChIP

Cette technique a été utilisée pour étudier le statut du promoteur du gène *AICDA* dans les cellules B traitées ou pas avec la protéine Tat. Après isolation et fragmentation par la technique décrite par (Markozashvili et al., 2016), 21µg de chromatine ont été incubés toute la nuit à +4°C avec 25µl de PrG-Dynabeads (Sigma Aldrich) et 5µg d'anticorps de lapin anti-pan Histone 3 acétylé (panH3Ac) (Merck Millipore) ou 2µg d'IgG de lapin pour immunoprécipiter les séquences d'ADN enrichies en pan H3Ac. Après dissociation de la liaison ADN-Protéine (reverse crosslink), les fragments d'ADN ont été purifiés puis hybridés sur une puce à ADN couvrant les régions promotrices des gènes du génome humain (two-colored SurePrint G3 Human promoter Microarray, 1 x 1 M (G4873A ; Agilent) suivant le protocole d'Agilent mammalian ChIP-chip version 9.0. Les résultats de la ChIP-sur-ChIP ont été analysés suivant le protocole décrit par (Allinne et al., 2014; Markozashvili et al., 2016).

10. Patients

10.1. Considérations éthiques

L'approbation du Comité d'Ethique de la Recherche de l'Université Cheikh Anta Diop de Dakar (Sénégal) Référence N° 0402/2019/CER/UCAD a été obtenue pour le recrutement des enfants. Le recrutement des patients VIH a été approuvé par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament Française (2016-A01316-45). Tous les individus ayant participé à l'étude ont été enrôlés après leur consentement libre et éclairé ou celui de leur parent ou tuteur légal pour les enfants.

10.2. Recrutement des patients et prélèvements sanguins

⇒ *Patients VIH-positif*

Treize PVVIH sous traitement antirétroviral (ARV), suivis au Service d'Immunologie Clinique de l'Hôpital Saint-Louis, Paris, France ont été recrutés. Pour chaque patient, 10ml de sang total ont été recueillis dans un tube EDTA pour la purification des lymphocytes B. Le tableau X représente quelques données épidémiologiques et biologiques des patients. L'isolement des PBMC et la purification des lymphocytes B ont été réalisés comme précédemment décrit mais dans un laboratoire de niveau 3.

Tableau X: Caractéristiques épidémiologiques et paramètres biologiques des 13 PVVIH

Patients	Test	Durée du TTT ARV	Charge virale VIH	Taux de CD4+	Colocalisation MYC-IGH	Concentration sérique de Tat
#, Sexe (Age, Années)	#	(Mois)	(Log ₁₀ copies/ml)	(x10 ⁶ /ml)	(% B cell nuclei)	(ng/ml)
1, M (69)	1	0	6.37	20	5.0	0.34
2, M (49)	1	19	<1.3	683	9.0	0.67
3*, F (48)	1	54	<1.3	428	3.9	0.40
	2	59	<1.3	535	17.0	1.55
4, M (47)	1	25	<1.3	417	20.0	2.91
5*, F (51)	1	102	<1.3	556	33.8	0.21
	2	106	<1.3	590	21.4	0.38
6*, M (59)	1	66	<1.3	747	7.4	1.14
	2	72	<1.3	525	52.6	2.27
7, F (56)	1	100	<1.3	502	31.7	2.83
8, M (33)	1	11	<1.3	619	23.1	4.06
9, F (62)	1	73	<1.3	536	12.8	9.02
10, M (52)	1	228	<1.3	494	36.8	0.27
11, M (66)	1	98	1.78	527	28.9	1.70
12, M (48)	1	0	4.83	247	35.0	5.72
13, M (64)	1	203	<1.3	737	22.8	0.78

* Les patients 3, 5 et 6 ont été testés deux fois à quelques mois d'intervalles. TTT ARV = Traitement antirétroviral

⇒ **Enfants sénégalais**

Les enfants ont été recrutés aux services de Pédiatrie des Centres Hospitaliers Universitaires Aristide le Dantec et Abass Ndao de Dakar, Sénégal. Ont été enrôlés des enfants âgés entre 2 et 15 ans, soit hospitalisés en Pédiatrie pour une pathologie bénigne, soit reçu en consultation en dehors de toute suspicion ou de tout diagnostic de néoplasie quelle qu'en soit l'origine. Les enfants qui présentaient un mauvais état général ou une anémie sévère n'ont pas été inclus. Chaque enfant a fait l'objet d'un prélèvement de 15ml de sang veineux périphérique dont 5ml recueillis dans un tube sec et les 10ml restants dans un tube contenant de l'EDTA comme anticoagulant. Les tubes ont été centrifugés à 1500tours/mn pendant 5mn. Cinquante microlitres du sérum obtenu après centrifugation des tubes secs ont été utilisés pour faire la sérologie EBV, le reste a été réparti dans 2 à 3 tubes eppendorf et conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure. Une partie du plasma obtenu après centrifugation des tubes EDTA a été également répartie dans des tubes eppendorf et stockée à -80°C. Le reste sera utilisé pour la séparation des PBMC et la purification des lymphocytes B. Les cellules B ont par la suite été utilisées pour déterminer le taux de colocalisation *MYC-IGH* chez les enfants. L'isolement des PBMC et la purification des lymphocytes B ont été réalisés comme précédemment décrit.

10.3. Sérologie EBV et classification des enfants en fonction du profil sérologique

Une sérologie EBV qualitative a été réalisée pour tous les enfants, incluant la recherche d'IgM anti-VCA p18 et/ou IgM anti-Zebra, IgG anti-VCA p18 et IgG anti EBNA1 par technique d'immuno-filtration. Nous avons utilisé le kit de diagnostic rapide de Bio-Rad RDT EBV IgG Assay (Ref 70720) pour les IgG anti-VCA et anti-EBNA1 et le kit RDT EBV IgM Assay (Ref 70721) pour les IgM anti-VCA p18 et/ou anti-Zebra, selon les recommandations du fabricant. Brièvement, un test se fait en 4 étapes :

- 1^{ère} étape : pour chaque cassette, 25µl de sérum sont dilués dans 1,5ml de tampon de dilution
- 2^{ème} étape : verser la totalité de l'échantillon dilué dans la fenêtre de la cassette prévue à cet effet et attendre 15 secondes. Les antigènes correspondants aux anticorps recherchés sont immobilisés sur la membrane au niveau de zones T1 ou T2 identifiées sur la cassette. La troisième zone C de la cassette est composée de protéine A immobilisée sur la membrane.

Lorsque l'échantillon dilué passe à travers la membrane, les éventuels anticorps présents vont se fixer sur la bande test (T1 ou T2) correspondante.

- 3^{ème} étape : Distribuer 1,5 ml de conjugué dans la fenêtre de la cassette et attendre l'absorption totale du liquide. Le conjugué, qui correspond à un anticorps monoclonal de souris anti-immunoglobuline humaine marqué avec des particules de latex bleu, va réagir avec les anticorps capturés par les antigènes de la membrane et avec la protéine A pour donner une coloration bleue respectivement sur les bandes tests T1 et/ou T2 et sur la bande contrôle C.
- 4^{ème} étape : Distribuer 1,5ml de tampon de lavage dans la fenêtre de la cassette et lire immédiatement le résultat après absorption totale de la solution de lavage. La bande contrôle C doit obligatoirement être bleue pour valider le test.
 - Pour les cassettes EBV-M : la présence d'une bande T1 correspond à la présence d'IgM anti-VCA p18 et/ou IgM anti-Zébra
 - Pour les cassettes EBV-G : une bande T1 correspond à la présence d'IgG anti-VCA p18 et une bande T2 à celle d'IgG anti-EBNA1.

L'interprétation du stade de l'infection a été faite en fonction du profil sérologique, conformément à la figure 28

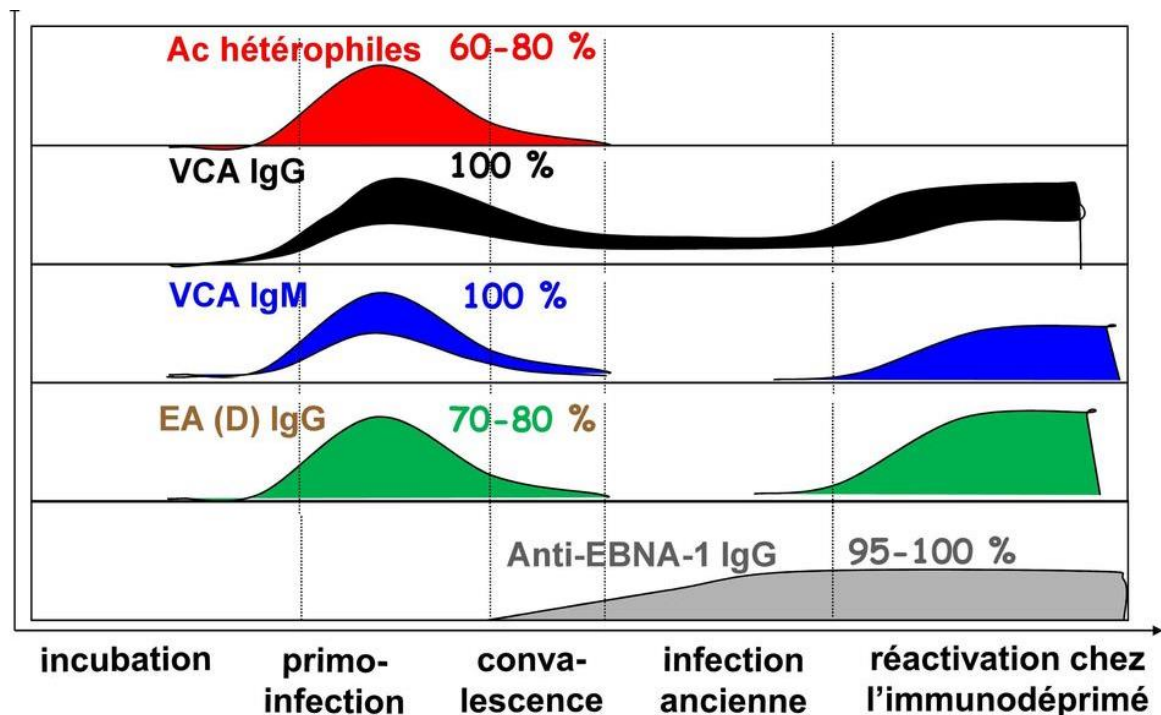


Figure 28: Profil sérologique EBV en fonction du stade de l'infection

11. Analyses statistiques

Les données obtenues ont été analysées avec le logiciel GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad software Inc., La Jolla, CA). Le test d'analyse de la variance (ANOVA) avec le post test de Bonferroni a été utilisé pour comparer 3 groupes ou plus. Le test de Student (t test) a été utilisé pour comparer deux groupes d'échantillons. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

Résultats

1. Article 3 : La réactivation du virus EBV induit la proximité des loci *MYC* et *IGH* dans les cellules B infectées favorisant leur translocation

Cette première partie des résultats est consacrée au rôle joué par le virus EBV dans la formation de la translocation t(8 ;14) impliquant l'oncogène *MYC* sur le chromosome 8 et le gène des chaînes lourdes d'Immunoglobuline *IGH* sur le chromosome 14. Cette translocation chromosomique est retrouvée dans 80% des LB, toutes formes cliniques confondues. Ce travail cible essentiellement la forme endémique qui est celle associée au virus EBV dans la quasi-totalité des cas et retrouvée essentiellement en Afrique subsaharienne. Ainsi, malgré une présence quasi-systématique du virus EBV dans les cellules tumorales qui contiennent la translocation, une implication directe du virus EBV dans les mécanismes de formation de ce réarrangement chromosomique n'avait jamais été établie. Nos résultats montrent que le cycle lytique du virus EBV dans les cellules lymphoblastoïdes, qu'il soit spontané ou induit, était associé à une proximité anormale des loci *MYC* et *IGH*, normalement situés dans des compartiments nucléaires différents. Grâce à l'outil d'ingénierie génique CRISPR/Cas9, nous avons développé une lignée cellulaire expérimentale dans laquelle nous pouvons induire la translocation t(8 ;14) et la détecter puis quantifier par PCR quantitative. L'utilisation de ce modèle expérimental nous a permis de montrer que la proximité *MYC-IGH* induite par la réactivation du virus augmentait la probabilité de translocation entre les deux loci en cas de cassures double brins d'ADN simultanées. Nous nous sommes ensuite intéressés aux mécanismes d'induction de cette proximité *MYC-IGH* au cours de la réactivation. Nos résultats montrent que la protéine Zebra, qui induit le passage de la phase de latence au cycle lytique, n'était pas à elle seule suffisante pour induire cette proximité dans les cellules B non infectées par EBV. Nous montrons par la suite que la réactivation du virus EBV induisait un mouvement de *MYC* vers *IGH* en réponse à un dommage d'ADN sur *MYC* et l'implication de la protéine de réparation d'ADN MRE11 dans ce processus de mouvement de loci.

Epstein-Barr Virus reactivation induces *MYC-IGH* spatial proximity and Burkitt's Lymphoma specific translocation in infected B cells.

(en préparation)

Fatimata Bintou Sall^{1,2}, Anna Shmakova¹, Tatyana Tsfasman¹, Nikolai Lomov^{1,3}, Awa Oumar Toure², Joëlle Wiels¹, Marc Lipinski¹, Svetlana Dokudovskaya¹, Diego Germini^{1,5}, Yegor Vassetzky^{1,4,5}

¹UMR9018, Université Paris-Saclay, CNRS, Gustave Roussy, Villejuif, France

²Faculty of Medicine, Pharmacy and Odontology, Cheikh Anta Diop University of Dakar, Senegal

³Faculty of Biology, State University of Moscow, Russia

⁴Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵Corresponding authors:

yegor.vassetzky@cnrs.fr

germinidiego@gmail.com

Summary

Burkitt lymphoma (BL) is an aggressive non-Hodgkin B cell malignancy associated with the Epstein-Barr virus (EBV). 80% of BL cases are characterised by chromosomal translocation involving the *MYC* oncogene and the immunoglobulin heavy chain gene (*IGH*) - t(8;14); the role of EBV in promoting the formation of BL-specific translocation remains largely unknown. Here we studied the role of EBV in t(8;14) generation. Using a CRISPR/Cas9-based B cell model to induce specific DNA double strand breaks in *MYC* and *IGH* loci, we provide the first experimental evidence that EBV reactivation from latency leads to an increase of t(8;14) translocations. We have demonstrated that this event relies on the newly acquired proximity between *MYC* and *IGH* loci, otherwise located far away in the nuclear space, induced by EBV reactivation. We show that specific DNA damage on *MYC* locus, followed by the MRE11-dependent error-prone DNA repair by non-homologous end joining (NHEJ) plays a role in the increased *MYC-IGH* proximity and subsequent translocation.

Keywords

EBV; lymphomagenesis; t(8;14); CRISPR/Cas9; MRE11; NHEJ.

Graphical abstract

Introduction

Burkitt lymphoma (BL) is a rare but extremely aggressive non-Hodgkin B cell malignancy with a geographically variable incidence and features. In Europe and US, BL is sporadic or associated with the human immunodeficiency virus (HIV) and is weakly associated with the Epstein-Barr virus (EBV), while in specific African regions, it is endemic and nearly always associated with EBV. (Bornkamm, 2009; Brady et al., 2007; Mawson and Majumdar, 2017; Moormann and Bailey, 2016).

EBV, the first described human oncovirus, is a γ -herpesvirus infecting mainly B lymphocytes. Its life cycle is composed of two distinct phases: the lytic phase when viral particles are produced; and the latent phase when the viral genome persists as an extrachromosomal episome in the host cell nucleus throughout all its lifetime (Amon and Farrell, 2005; Cohen, 2000; Epstein et al., 1965; Tsurumi et al., 2005). Each phase is characterized by the expression of specific viral genes and proteins. The switch from latency to lytic cycle is mainly triggered by the *BZLF1* gene encoding for the transcriptional activator Zebra (or Zta), and the *BRLF1* gene encoding for the transcriptional activator Rta, both being expressed at the onset of the lytic cycle. Zebra and Rta expression is often used as a marker of lytic cycle activation (Countryman and Miller, 1985; Germini et al., 2020a; Grogan et al., 1987; Murata and Tsurumi, 2014).

In the African endemic area known as "lymphoma belt", different cofactors may contribute to BL pathogenesis through EBV reactivation in latently infected B cells: the *Plasmodium falciparum* parasite, the *Euphorbia tirucalli* plant latex used for ornamental and medical purposes and the food contaminant Aflatoxin B1 produced by moulds of the *Aspergillus* family (Accardi et al., 2015; MacNeil et al., 2003; Mannucci et al., 2012; Torgbor et al., 2014)

Regardless of its origin, BL cells always display a chromosomal translocations involving the *MYC* oncogene (on chromosome 8) and one of the genes coding for the immunoglobulin heavy (*IGH*) or light chains (*IGK* and *IGL*) (on chromosomes 14, 2 and 22, respectively); the t(8;14) translocation is found in 80% of cases (Allday, 2009; Molyneux et al., 2012; Saleh et al., 2020; Torgbor et al., 2014). So far, the specific mechanisms leading to the BL-specific *MYC-IGH* translocation remain largely unknown.

To be generated, a translocation requires simultaneous DNA double strand breaks (DSBs) on the two partner chromosomes, DSB repair through the error-prone non-homologous end-joining (NHEJ) pathway and the spatial proximity of the two partners (Iarovaia et al., 2014; Roix et al., 2003; Roukos et al., 2013). EBV, in both its life cycle phases, can interact with chromatin remodelling complexes, or lead to epigenetic alteration, DNA damage and, consequently, to B cell nuclear remodelling (reviewed in (Sall et al., 2018)). By inducing unusual loci proximity these effects can thus also predispose to chromosomal translocation. Nevertheless, there is still no direct evidence for EBV implication in BL specific t(8;14) translocation.

Here, we investigated the role of EBV in t(8;14) generation. Using an experimental system for specific induction of t(8;14) in EBV-transformed B cells, we provided the first direct demonstration that EBV reactivation led to an increased rate of the *MYC-IGH* colocalizations which promoted a higher rate of the t(8;14). This newly acquired *MYC-IGH* proximity can be triggered by a specific DNA damage on *MYC* locus and driven by the subsequent MRE11 dependent DNA repair.

Material and Methods

Cells

Human EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs) used in this study were RPMI8866, PRIESS, M81 and B048. We also created RPMI8866 cell lines that inducibly express CRISPR/Cas9 and guide RNAs (gRNAs), targeting both *MYC* and *IGH*; *MYC* only; *IGH* only and both *AML* and *ETO* loci named MYCIGHC9, MYCC9, IGHC9 and AMLETOC9, respectively. Cells were transfected and gRNAs efficiency was tested exploiting techniques and protocols developed in the laboratory (Canoy et al., 2020; Germini et al., 2017a). The sequences of gRNAs are listed in **Supplementary table 1**. Primary human B cells were isolated from healthy blood donors by negative selection from total PBMCs. Cells were treated as described in **Supplementary Table 2**.

Western blot

Cell pellets were resuspended in the NETN buffer and sonicated. Proteins (30 µg) were resolved on 4-12% SDS-PAGE gels, transferred onto a PVDF membrane and probed with the following primary antibodies: mouse anti-Cas9; mouse anti-Zebra; rabbit anti- α -tubulin and mouse anti- β -actin. Secondary HRP-conjugated antibodies were used to reveal bands. Western blot band intensity quantification was performed using the ImageJ software. The band intensity of a target protein was normalized to the band intensity of the indicated loading control protein.

Quantitative PCR and RT-PCR

Total DNA was extracted using Nucleospin® Tissue DNA purification kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. 500 ng genomic DNA was amplified using primers specific for the t(8;14) translocation and control primers designed ~6.5 kbp downstream of the breakpoint sequence in the *MYC* gene. For RT-PCR, total RNA was extracted using Nucleospin® RNA II purification kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed as previously described (Sall et al., 2019). PCR amplification was performed using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) following the manufacturer's protocol. The $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method was used for quantification. Primer sequences are listed in **Supplementary Table 3**.

3D-FISH, Immuno-3D FISH, microscope image acquisition and analysis

Cells were processed for 3D-FISH or immuno-3D-FISH as previously described (Germini et al., 2017b). Nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired using a multiphoton SP8

confocal microscope (Leica Microsystems, Berlin, Germany). Imaris software (Bitplane) was used to analyze gene localization. The LEICA Application Suite X (Leica Microsystems) software was used to evaluate the percentage of cells that have γ H2AX or 53BP1 foci colocalized with *MYC* and/or *IGH*.

Statistics

All statistical tests were performed using the Graphpad Prism 5 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA). One-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni's post-test or Student's t-test was used to compare averages between different groups. Data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM).

Results

1. EBV reactivation leads to *MYC-IGH* colocalization in LCLs.

EBV infection and reactivation are accompanied by large-scale changes in the nuclear architecture (Kim et al., 2020; Li et al., 2010; Moquin et al., 2018) that may change the nuclear localization of potential translocation partner loci. In human naive B cells, *MYC* and *IGH* loci are separated in the nuclear space (Germini et al., 2017b; Sklyar et al., 2016) and therefore poorly susceptible to be involved in translocations. To study the effect of EBV reactivation on *MYC* and *IGH* spatial localization within the nuclear space, we first tested the virus reactivation conditions in LCLs used in this study.

To determine the most effective inducer of the lytic cycle, RPMI8866 and PRIESS cells were treated for 24h and 48h with the following lytic cycle activators: 12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), trichostatin (TSA), abexinostat (S78), sodium butyrate (NaB) or recombinant Zebra protein (Davies et al., 1991; Hui et al., 2012; Murata and Tsurumi, 2014). Zebra protein expression was used as the marker of EBV reactivation and was determined by Western blot analysis. In the RPMI8866 cell line, the strongest and most reproducible ZEBRA expression was observed following 24h of treatment with the recombinant Zebra protein and NaB (fold change vs. unstimulated control: 4.77 ± 0.56 and 4.99 ± 0.65 , respectively; $p < 0.001$; **Figure 1a**). Lytic cycle induction in cells treated with recombinant Zebra protein was then confirmed by evaluating the expression of the EBV immediate early gene *BRLF1* by qRT-PCR. Consistently with Zebra expression, *BRLF1* was overexpressed 24h after Zebra treatment as compared to the untreated cells (fold change 2.56 ± 0.26 ; $p < 0.001$; **Figure 1b**). Thus, for the following experiments, we used Zebra protein and NaB to induce the lytic cycle in RPMI8866 cells. For PRIESS cells, S78 and recombinant Zebra protein were found to be the most potent lytic cycle inducers (fold change 3.05 ± 0.81 and 2.58 ± 0.10 respectively; $p < 0.01$; **Supplementary Figure 1a**).

We next analysed the localization of the *MYC* and *IGH* loci in the tridimensional nuclear space of both primary B cells and B cell lines using 3D-Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) followed by image acquisition with a confocal microscope and image analysis with the Bitplane Imaris software. Different experimental conditions were used: EBV-negative primary B cells

purified from peripheral blood of healthy donors, RPMI8866 and PRIESS upon EBV reactivation, PRIESS and PRIESS upon EBV reactivation. In RPMI8866 and PRIESS, both *MYC* and *IGH* loci were found in the same centermost nuclear locations (data not shown). We next measured the colocalization between these loci as defined when the centers of the *MYC* and *IGH* fluorescent foci were 1 μm or less from each other; a representative 3D-FISH image of *MYC* (red signal) and *IGH* (green signal) colocalization in RPMI8866 cells is shown in **Figure 2a**. In naive B cells isolated from healthy donors, *MYC* and *IGH* loci were colocalized in $5.80\% \pm 0.57$ cells ($n=180$ cells); in latent non-treated RPMI8866 and PRIESS cells, *MYC* and *IGH* loci colocalization was also low ($4.55\% \pm 0.88$ and $2.80\% \pm 0.78$, respectively; $n \geq 100$ cells; **Figure 2b**). It should be noted that in our experiments, any two human gene loci show a background colocalization of 2-3% (data not shown).

Lytic cycle induction in RPMI8866 cells increased the *MYC-IGH* colocalization twofold ($8.7\% \pm 0.56$ in NaB treated cells and $9.52\% \pm 0.25$ in Zebra-treated cells vs $4.55\% \pm 0.88$ in latent RPMI8866 cells; $p < 0.001$; $n \geq 200$ cells; **Figure 2b**). Lytic cycle activation in PRIESS cells led to a similar increase in the colocalization between the *MYC* and *IGH* loci as compared to the untreated PRIESS ($6.97\% \pm 0.26$ in S78-treated cells and $6.41\% \pm 0.53$ in Zebra-treated cells vs $2.78\% \pm 0.78$; $p < 0.001$ and $p < 0.01$, respectively; $n \geq 100$ cells; **Supplementary Figure 1b**). Thus, EBV reactivation leads to a significant increase in *MYC-IGH* colocalization rate in lymphoblastoid cell lines.

We next tested whether the observed *MYC-IGH* colocalization upon EBV reactivation could be a direct effect of the Zebra protein. Indeed, Zebra interacts with host genes and may thus affect their expression and, consequently, spatial localization (reviewed in (Germini et al., 2020b)). We purified B cells from healthy donors and treated them with the recombinant Zebra protein for 6h, 24h and 48h. Zebra was detectable in B cells 6h after treatment, peaked at 24h and remained in the cells at 48h (**Figure 2c**). There was no difference in *MYC-IGH* colocalization rate in Zebra-treated B cells as compared to the untreated control ($5.70\% \pm 1.60$ at 24h and $3.70\% \pm 1.05$ at 48h vs $5.80\% \pm 0.57$ in control cells; $n \geq 180$ cells; **Figure 2d**). Thus, Zebra alone was not sufficient to induce *MYC-IGH* proximity in B cells and that its effect was rather related to EBV reactivation.

2. Spontaneous EBV lytic increases spatial proximity between the *MYC* and *IGH* loci

To confirm that EBV lytic cycle affects the proximity of the *MYC* and *IGH* loci, we used two additional LCLs M81 and B048, characterized by a high spontaneous lytic activity (Delecluse et al., 2020; Tsai et al., 2013). M81 and B048 are LCLs generated by infection of marmoset B cells with EBV isolated respectively from a Chinese Nasopharyngeal Carcinoma and a German Stem Cell Transplant recipient. Their spontaneous lytic activity was assessed by expression of EBV immediate early (*BZLF1* and *BRLF1*) and late (*BDRF1* and *BLLF1*) genes. The expression of all these genes was constantly higher as compared to RPMI8866 where the EBV is in latent form. Mean fold changes of gene expression in M81 and B048 cells were as follows: 1.87 ± 0.17 and 1.56 ± 0.15 for *BZLF1*; 29.48 ± 4.76 and 15.32 ± 4.20 for *BRLF1*; 6.54 ± 1.27 and 5.64 ± 1.67 for *BDRF1* and 3.97 ± 1.13 and 2.48 ± 0.36 for *BLLF1*, respectively (**Figure 3a and 3b**,

Supplementary Figure 2a and 2b). As lytic activity is spontaneous in M81 and B048 cells, mRNA levels of the EBV genes were variable from one experiment to another.

Both M81 and B048 presented a significantly higher *MYC-IGH* colocalization rate as compared to non-stimulated RPMI8866 ($14.98\% \pm 1.59$ in M81 cells and $15.54\% \pm 1.77$ in B048 cells vs. $4.56\% \pm 0.62$ in RPMI8866; $p < 0.05$; $n \geq 200$ cells **Figure 3c**). These results support our conclusion that EBV reactivation leads to the proximity between the *MYC* and *IGH* loci in the nuclear space.

3. Development and characterization of the MYCIGHC9 cell line to study *MYC-IGH* translocation frequency

To analyze whether *MYC-IGH* spatial proximity is a prerequisite for generation of a translocation between the two loci, we created an experimental system for targeted generation of double strand breaks (DSBs) in the *MYC* and *IGH* loci. In normal B cells, spontaneous translocations are exceedingly rare, occurring in approximately $1/10^6$ cells (Küppers and Dalla-Favera, 2001), and thus undetectable by standard cytogenetic techniques. In addition, endemic Burkitt lymphoma translocations occur over large chromosomal regions, making these translocations undetectable by PCR. Thus, to address the question whether EBV-induced *MYC-IGH* proximity is associated with a higher translocation frequency, we developed a RPMI8866-derived MYCIGHC9 cell line containing the *Cas9* gene and gRNAs targeting the *MYC* and *IGH* loci under the control of a (Dox)-inducible promoter (see Materials and Methods). In the presence of Dox, the Cas9 nuclease and two gRNAs are expressed and DSBs are specifically generated in the *MYC* and *IGH* loci. In some cells, repair of these DSBs by NHEJ would generate the *MYC-IGH* t(8;14) translocation. This translocation can then be detected and quantified by PCR using specific primers surrounding the chromosomal break (Germini et al., 2017a) (**Supplementary Figure 3**).

Cas9 expression started 3h after Dox treatment (**Figure 4a**). In order to monitor the specific induction of DSBs, we carried out 3D-FISH followed by immunostaining (immuno-3D-FISH) with the antibodies against γ H2AX to detect DNA damage in the *MYC* and *IGH* loci. The damage peaked at 6h post-Dox treatment (**Figures 4bc**). Using a forward *MYC* primer and a reverse *IGH* primer, we detected t(8;14) translocations by end-point PCR 24h after Dox treatment (**Figure 4d**). The more sensitive quantitative PCR was then applied to quantify the *MYC-IGH* translocation. t(8;14) appeared already at 12h after Dox treatment, then the translocation rate increased at 24h (fold change 24h Dox-treated vs 12h Dox-treated cells 9.25 ± 0.38 ; $p = 0.05$; **Figure 4e**) and peaked at 48h (fold change 48h Dox-treated vs 12h Dox-treated cells $25.10 \pm 4.58.86$; $p < 0.001$; **Figure 4e**). We estimated that 24h after Dox treatment, translocation rate was $\sim 8 \times 10^{-3}$ and these experimental conditions were used for the following experiment.

We next used DNA repair inhibitors to get insight into the mechanism of the translocation generation in our model. We treated MYCIGHC9 cells with inhibitors of different repair pathways: homologous recombination (HR), classical and alternative NHEJ (cNHEJ and aNHEJ, respectively) simultaneously with Dox. Treatment with Mirin, an inhibitor of MRE11 that is

involved in both HR and NHEJ pathways significantly decreased the t(8;14) translocation rate (fold change 0.60 ± 0.02 ; $p < 0.05$; **Figure 4f**). On the other hand, the DNA-PK inhibitor NU 7026 which specifically affected the cNHEJ pathway significantly increased the frequency of the *MYC-IGH* translocation (fold change 3.68 ± 0.13 ; $p < 0.0001$; **Figure 4f**) while inhibition of the aNHEJ by DNA ligase I and III inhibitor L67 decreased the translocation frequency (fold change 0.28 ± 0.10 ; $p < 0.01$; **Figure 4f**). Thus, the t(8;14) mainly occurs via aNHEJ repair pathway in our model; this is consistent with the fact that translocations preferentially occur through aNHEJ which is more error prone (Simsek and Jasin, 2010; Soni et al., 2015).

4. EBV reactivation-induced *MYC-IGH* spatial proximity increases the probability of t(8;14)

Using the MYCIGHC9 cell line, we investigated whether the increase in the *MYC-IGH* colocalization level, induced by the EBV reactivation, resulted in a higher *MYC-IGH* translocation frequency. MYCIGHC9 cells were treated either with the recombinant Zebra protein or NaB for 48h to induce EBV reactivation and therefore an increased *MYC-IGH* proximity. Cas9 and gRNAs expression was then induced by addition of Dox. After additional 24 hours, cells were collected for t(8;14) quantification by qPCR. The experimental setup is schematized in **Figure 5a**. EBV reactivation with Zebra and NaB, which leads to the spatial proximity between the two loci, was followed by a 2.07 ± 0.28 and 3.72 ± 0.56 fold increase in the translocation rate, respectively ($p < 0.01$ and $p < 0.001$; **Figure 5b**). These data provide the first experimental proof that gene proximity increases the probability of a chromosome translocation.

5. Specific DNA damage within the *MYC* locus and MRE11 protein are involved in EBV-induced *MYC-IGH* spatial proximity.

The increase in the colocalization rate between the *MYC* and *IGH* loci observed after EBV reactivation (**Figure 2b**) could be a consequence of a displacement of one or both loci. DNA damage induction is one of the factors that can lead to loci movement within the nuclear space (Iarovaia et al., 2014). We next analyzed the proximity of *MYC*, *IGH* and control loci in different conditions in our experimental system.

We first used the MYCIGHC9 line to study *MYC* and *IGH* relative positioning following specific DSBs. We observed a significantly increased colocalization between these loci 48h after Dox treatment ($10.20\% \pm 1.67$ in Dox treated cells vs. $4.65\% \pm 0.34$ in the control; $p < 0.05$; $n \geq 120$ cells, **Figure 6a**). To test whether the observed *MYC-IGH* colocalization occurring after the introduction of DSBs within the *MYC* and *IGH* loci is specific, we analysed the *IGH* colocalization with another known translocation partner, *CCND1* (Vogt et al., 2017) located on chromosome 11, 48h after Dox treatment of the MYCIGHC9 line. Although a slight increase in the colocalization rate between the *CCND1* and *IGH* was observed, it was not statistically significant ($9.23\% \pm 1.7$ in Dox treated cells vs. $6.54\% \pm 0.76$ in the control; $p < 0.05$; $n \geq 120$ cells, **Figure 6b**).

We have also used the AMLETOC9 cell line where Dox activates expression of Cas9 and gRNA targeting the *ETO* locus located on chromosome 8 and *AML* locus located on chromosome 21.

Induction of DSBs in these loci led to a slight decrease in colocalization between the *MYC* and *IGH* loci ($2.76\% \pm 0.92$ in Dox treated cells vs. $5.04\% \pm 0.39$ in control; $n \geq 100$ cells, **Figure 6c**). These results demonstrate the specificity of the described effect.

We next tested whether induction of a single DSB in either *MYC* or *IGH* locus would affect the proximity between the two genes. Using the IGHc9 or MYCC9 cell lines where DSBs were induced only either in *IGH* or *MYC* loci respectively, we did not observe any increase in the *MYC-IGH* colocalization rate when DSBs were induced the *IGH* locus only ($3.86\% \pm 1.32$ in Dox treated cells vs. $4.28\% \pm 0.49$ in control; $n \geq 160$ cells, **Figure 6d**); on the contrary, when only *MYC* was damaged, we observed an increased *MYC-IGH* colocalization rate ($5.90\% \pm 0.11$ vs. $3.60\% \pm 0.06$; $p < 0.01$; $n \geq 85$ cells **Figure 6e**).

All these results taken together suggest that in our systems, specific DNA damage within *MYC*, rather than *IGH* locus was required for the *MYC-IGH* proximity to occur and therefore, it is highly likely that *MYC*, when damaged, moves toward *IGH*.

Moreover upon DNA damage induction in the MYCC9 cell line, *MYC* was found simultaneously colocalized with *IGH* and the p53-binding protein 1 (53BP1), DNA repair factor that accumulates in repair foci where *IGH* is often located in B-cells (Bekker-Jensen and Mailand, 2010; Feldman et al., 2017). This event shows the possibility that *MYC* and *IGH* could be repaired within the same repair factory, thus increasing the possibility that they could erroneously recombine. A representative image of this event is shown in **Supplementary Figure 4**.

Since the induction of lytic cycle triggers DNA damage response in B cells (reviewed in (Hau and Tsao, 2017)), we next wanted to understand whether lytic cycle induction in RPMI8866 cells caused any DNA damage within the *MYC* locus. We induced lytic cycle by treating cells with the recombinant Zebra protein and quantified the percentage of cells showing specific DNA damage within at least one *MYC* locus as revealed by colocalization between *MYC* loci and γ H2AX foci using immuno-3D FISH. DNA damage within the *MYC* loci was also analyzed in the cell lines with the spontaneous EBV reactivation. Both induced (RPMI8866 + Zebra) and spontaneous (M81 and B048) EBV reactivation was associated with an increased level of DNA damage in the *MYC* locus ($27.48\% \pm 4.01$ Zebra treated RPMI8866; $23.99\% \pm 2.30$ M81 cells; $19.00\% \pm 1.37$ B048 cells vs. $9.41\% \pm 2.23$ RPMI8866 unstimulated cells; $p < 0.01$; $p < 0.001$; $p < 0.01$ respectively; $n \geq 380$ cells **Figure 7a**). A representative immuno 3D-FISH image of *MYC*- γ H2AX colocalization is shown in **Figure 7b**. As simultaneous DNA damage in the *MYC* and *IGH* loci is required to generate the t(8;14), we have also checked for the presence of DNA damage within the *IGH* locus in the same cells. It occurs more frequently upon EBV reactivation as compared to control RPMI8866 (data not shown). Simultaneous DNA damage within the *MYC* and *IGH* loci when they are located close to each other was also detected and even if this observation is not statistically significant, it illustrates the fact that DSBs can occur simultaneously within both loci when they are in close proximity. This may increase the risk of chromosomal translocations. Representative images of DNA damage on *IGH* and simultaneous

DNA damage within the *MYC* and *IGH* loci following EBV reactivation are shown in **Supplementary Figure 5**.

One of the components of the DNA repair process, MRE11, was previously implicated into the movement of chromatin loci (Caridi et al., 2018; Germini et al., 2017b). Thus, we explored a potential role of MRE11 in loci movement in our model. Our results showed that EBV reactivation is accompanied by *MRE11* gene overexpression (fold change 1.68 ± 0.11 Zebra treated RPMI8866 cells; 1.57 ± 0.11 M81 cells and 2.40 ± 0.16 B048 cells vs. unstimulated RPMI 8866 cells; $p < 0.001$; $p < 0.01$ and $p < 0.0001$ respectively; **Figure 7c**). More interestingly, MRE11 inhibition by Mirin in EBV-reactivated cells, blocked the increase in *MYC-IGH* proximity; while inhibition of DNA-PK (involved in the cNHEJ) by NU7026 Rad51 (involved in homologous recombination) by B02 or Ligase III (involved in altNHEJ) by L67 did not affect *MYC-IGH* colocalization rate ($6.93\% \pm 1.08$ in Zebra+Mirin treated cells; $10.2\% \pm 2.6$ in Zebra+NU7026 treated cells; $13.16\% \pm 1.79$ in B02+Zebra treated cells; $16.28\% \pm 2.16$ in L67 treated cells vs $10.49\% \pm 1.16$ in Zebra treated cells, $n \geq 100$ cells) (**Figure 7d**). The same decrease in the *MYC-IGH* colocalization rate was found in the presence of MRE11 inhibition but not upon DNA-PK inhibition in the MYCIGHC9 cell line upon induction of DNA damage on *MYC* and *IGH* ($5.42\% \pm 0.92$ in Dox+Mirin treated cells, $9.67\% \pm 1.52$ in Dox+NU7026 treated cells vs $8.87\% \pm 0.89$ in Dox treated cells, $n \geq 90$) (Supplementary Figure 6).

These data suggest that MRE11 as an actor in DNA damage response and not acting in a specific repair pathway could be a driving factor of *MYC* relocation towards *IGH* following lytic cycle induction.

Discussion

EBV oncogenicity has been, for a long time, mainly attributed to viral latency proteins (reviewed in (Farrell, 2019; Saha and Robertson, 2019)). In fact, the EBV productive lytic cycle results in infected cell lysis and death and thus an intrinsic oncogenic effect insofar was hardly conceivable (Münz, 2019). However, together with the productive lytic cycle, the existence of an abortive lytic cycle, i.e. incomplete, which does not lead to the production of new viruses, nor to the cell lysis, is now well known (Al Tabaa et al., 2009; Arvey et al., 2012; Chiu and Sugden, 2016; Ersing et al., 2017; Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018). The amount of hypothesis and evidence of the involvement of EBV abortive lytic cycle in EBV-associated cancers is growing (reviewed in (Germini et al., 2020a; Morales-Sánchez and Fuentes-Panana, 2018)).

BL is one of the most common EBV-related diseases, in particular its endemic form, where the virus is systematically present. In this work, we provided the first direct evidence that EBV reactivation predisposes to the insurgence of BL specific chromosomal translocation. We observed that EBV reactivation from latency leads to a significant increase in the proportion of B cells of different lines with the proximity of *MYC* and *IGH* loci, otherwise located distantly in the nuclear space.: a condition necessary for the translocation to occur. The transactivator protein Tat of HIV-1 induced *MYC-IGH* proximity in primary B cells *in vitro* and *in vivo* (Germini et al., 2017b). However, unlike HIV-Tat, the EBV transactivator protein Zebra does not appear to be solely responsible for this effect. Indeed, we found that *MYC-IGH* colocalization rate did not vary significantly in EBV-negative B cells treated with recombinant Zebra protein, making

the presence and reactivation of the virus indispensable for loci proximity. By the development of LCL model, which can inducibly break the *MYC* and the *IGH* loci, we managed to prove directly that the EBV induced *MYC-IGH* proximity leads to more t(8;14) in case of simultaneous double strand break.

The use of different experimental cell models allowed us to show that specific DNA damage on *MYC* and not on *IGH* could be a driving factor for inducing *MYC-IGH* proximity. In the same way, we showed that EBV reactivation significantly increased the rate of DNA damage on *MYC* that in turn potentially led to *MYC-IGH* proximity. The fact that acquired *MYC-IGH* proximity relies on specific DNA damage on *MYC* locus was already described by our team also in primary B cells treated with HIV-Tat (Germini et al., 2017b). However, the reason why specific DNA damage on *MYC* occurs during EBV reactivation remains an open question. The *MYC* downregulation observed during EBV reactivation (Ersing et al., 2017; Guo et al., 2020) could represent an interesting reflection path at this regard.

Another open question is the molecular mechanism at the basis of the *MYC* relocation next to *IGH*. Our results opened promising perspectives by hypothesizing a role for the DNA repair protein MRE11 in this phenomenon. The demonstrated overexpression of the *MRE11* gene upon EBV reactivation and the fact that its inhibition almost halves the *MYC-IGH* proximity after DNA damage are consistent with other published data. Indeed we have previously demonstrated the same reduction in *MYC-IGH* colocalization rate also in primary B cells upon treatment with Tat and inhibition of MRE11 (Germini et al., 2017b). Other groups also reported MRE11 protein involvement in heterochromatin breaks relocalization (Caridi et al., 2018) or have described the role of DNA damage-repair pathways in chromatin movement (Dion et al., 2012; Hauer and Gasser, 2017; Iarovaia et al., 2014). This increased chromatin movement following DSB may be deleterious leading to genomic translocation (Roukos et al., 2013b).

This described genomic features occurring after EBV reactivation is consistent with many known data that already pointed towards its important role in endemic BL. Indeed, all EBV endemic cofactors incriminated to play a role in endemic BL pathogenesis (*Plasmodium falciparum*, *Euphorbia tirucalli* and Aflatoxin) are reported to induce the lytic cycle *in vivo* (Accardi et al., 2015; Chêne et al., 2007; MacNeil et al., 2003). Moreover, it has been recently reported that children with an EBV-reactivated serological profile were more likely to develop endemic BL (Coghill et al., 2020). Unfortunately, *in vivo* proofs of EBV-induced *MYC-IGH* proximity are still lacking due to the difficulties of isolating EBV positive circulating B-cells (1-50/10⁶ cells in EBV latency and 1-10/10³ cells during reactivation) (Nijland et al., 2016).

Nevertheless, basing on our *in vitro* data and on published data, one hypothetical model could be proposed for children living in sub-Saharan endemic areas and exposed to EBV and *Plasmodium falciparum* or other endemic EBV activators. These children are usually infected with EBV early in their life (Henle and Henle, 1976; Thorley-Lawson, 2015) and are also chronically and repeatedly exposed, from an early age to *P. falciparum* (and/or *Euphorbia tirucalli* and/or Aflatoxin). EBV-infected B cells potentially undergo several reactivation episodes due to chronic exposure to these factors leading to *MYC-IGH* proximity, as observed *in vitro* upon EBV reactivation. As previously stated, in addition to *MYC-IGH* proximity, simultaneous DSB on the two loci could predispose to the t(8;14) development. *Plasmodium*

falciparum is known to induce in B cells, an aberrant expression of the enzyme AICDA (Robbiani et al., 2015; Torgbor et al., 2014). This enzyme is a known factor involved in t(8;14) development *in vivo* (Dorsett et al., 2007; Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008) introducing DSBs on *IGH* and, as off-target, on *IGH* proximal loci, including *MYC* (Chandra et al., 2015; Rocha et al., 2012) during somatic hypermutation and Class Switch Recombination processes.

Thus, in these children, a potential *MYC-IGH* proximity following frequent EBV reactivation, in association with *AICDA* overexpression, could increase the risk of simultaneous DSBs on the two loci and consequently the risk of t(8;14) production. The same model can be transposed to HIV-associated BL. Indeed, we have already demonstrated that the *MYC-IGH* proximity induced in B cells *in vitro* by Tat protein, is also present *in vivo* in circulating B cells from HIV1-infected patients. (Germini et al., 2017b). The same Tat protein also induces *AICDA* overexpression in B cells (Sall et al., 2019).

In summary, our data provided the first evidence of a direct involvement of EBV lytic cycle on BL chromosomal translocation insurgence *in vitro*. A potential role for the MRE11 protein has been suggested.

References

- Accardi, R., Gruffat, H., Sirand, C., Fusil, F., Gheit, T., Hernandez-Vargas, H., Le Calvez-Kelm, F., Traverse-Glehen, A., Cosset, F.-L., Manet, E., et al. (2015). The mycotoxin aflatoxin B1 stimulates Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in in vitro and in vivo experimental models. *Carcinogenesis* 36, 1440–1451.
- Al Tabaa, Y., Tuaillon, E., Bollore, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J.-M., Duperray, C., Desgranges, C., and Vendrell, J.-P. (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* 113, 604–611.
- Allday, M.J. (2009). How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Semin Cancer Biol* 19, 366–376.
- Amon, W., and Farrell, P.J. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15, 149–156.
- Arvey, A., Tempera, I., Tsai, K., Chen, H.-S., Tikhmyanova, N., Klichinsky, M., Leslie, C., and Lieberman, P.M. (2012). An Atlas of the Epstein-Barr Virus Transcriptome and Epigenome Reveals Host-Virus Regulatory Interactions. *Cell Host & Microbe* 12, 233–245.
- Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2010). Assembly and function of DNA double-strand break repair foci in mammalian cells. *DNA Repair* 9, 1219–1228.
- Bornkamm, G.W. (2009). Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: more questions than answers. *Int J Cancer* 124, 1745–1755.
- Brady, G., MacArthur, G.J., and Farrell, P.J. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 60, 1397–1402.
- Canoy, R.J., André, F., Shmakova, A., Wiels, J., Lipinski, M., Vassetzky, Y., and Germini, D. (2020). Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells. *Gene Ther*.
- Caridi, C.P., D'Agostino, C., Ryu, T., Zapotoczny, G., Delabaere, L., Li, X., Khodaverdian, V.Y., Amaral, N., Lin, E., Rau, A.R., et al. (2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* 559, 54–60.
- Chandra, V., Bortnick, A., and Murre, C. (2015). AID targeting: old mysteries and new challenges. *Trends in Immunology* 36, 527–535.

Chêne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2007). A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathogens* 3, 0826–0834.

Chiu, Y.-F., and Sugden, B. (2016). Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annu Rev Virol* 3, 359–372.

Coghill, A.E., Proietti, C., Liu, Z., Krause, L., Bethony, J., Prokunina-Olsson, L., Obajemu, A., Nkrumah, F., Biggar, R.J., Bhatia, K., et al. (2020). The Association between the Comprehensive Epstein-Barr Virus Serologic Profile and Endemic Burkitt Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 29, 57–62.

Cohen, J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343, 481–492.

Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4085–4089.

Davies, A.H., Grand, R.J., Evans, F.J., and Rickinson, A.B. (1991). Induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active protein kinase C. *J Virol* 65, 6838–6844.

Delecluse, S., Poirey, R., Zeier, M., Schnitzler, P., Behrends, U., Tsai, M.-H., and Delecluse, H.-J. (2020). Identification and Cloning of a New Western Epstein-Barr Virus Strain That Efficiently Replicates in Primary B Cells. *J Virol* 94.

Dorsett, Y., Robbiani, D.F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich, T.R., and Nussenzweig, M.C. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 2225–2232.

Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J Exp Med* 121, 761–770.

Ersing, I., Nobre, L., Wang, L.W., Soday, L., Ma, Y., Paulo, J.A., Narita, Y., Ashbaugh, C.W., Jiang, C., Grayson, N.E., et al. (2017). A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. *Cell Reports* 19, 1479–1493.

Farrell, P.J. (2019). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annu Rev Pathol* 14, 29–53.

Feldman, S., Wuerffel, R., Achour, I., Wang, L., Carpenter, P.B., and Kenter, A.L. (2017). 53BP1 Contributes to Igh Locus Chromatin Topology during Class Switch Recombination. *J Immunol* 198, 2434–2444.

Germini, D., Bou Saada, Y., Tsfasman, T., Osina, K., Robin, C., Lomov, N., Rubtsov, M., Sjakste, N., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. (2017a). A One-Step PCR-Based Assay to Evaluate the Efficiency and Precision of Genomic DNA-Editing Tools. *Mol Ther Methods Clin Dev* 5, 43–50.

Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O.V., Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., et al. (2017b). HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia* 31, 2515–2522.

Germini, D., Sall, F.B., Shmakova, A., Wiels, J., Dokudovskaya, S., Drouet, E., and Vassetzky, Y. (2020a). Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers (Basel)* 12.

Germini, D., Sall, F.B., Shmakova, A., Wiels, J., Dokudovskaya, S., Drouet, E., and Vassetzky, Y. (2020b). Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers (Basel)* 12, 1479.

Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., and Miller, G. (1987). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 1332–1336.

Guo, R., Jiang, C., Zhang, Y., Govande, A., Trudeau, S.J., Chen, F., Fry, C.J., Puri, R., Wolinsky, E., Schineller, M., et al. (2020). MYC Controls the Epstein-Barr Virus Lytic Switch. *Mol Cell* 78, 653–669.e8.

Hau, P.M., and Tsao, S.W. (2017). Epstein-Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle. *Viruses* 9.

Henle, W., and Henle, G. (1976). The sero-epidemiology of Epstein-Barr virus. *Adv Pathobiol* 5–17.

Hui, K.F., Ho, D.N., Tsang, C.M., Middeldorp, J.M., Tsao, G.S.W., and Chiang, A.K.S. (2012). Activation of lytic cycle of Epstein-Barr virus by suberoylanilide hydroxamic acid leads to apoptosis and tumor growth suppression of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 131, 1930–1940.

Iarovaia, O.V., Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S.V., and Vassetzky, Y.S. (2014). Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol Cancer* 13, 249.

Kim, K.-D., Tanizawa, H., De Leo, A., Vladimirova, O., Kossenkov, A., Lu, F., Showe, L.C., Noma, K., and Lieberman, P.M. (2020). Epigenetic specifications of host chromosome docking sites for latent Epstein-Barr virus. *Nature Communications* 11, 877.

Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580–5594.

Li, C., Shi, Z., Zhang, L., Huang, Y., Liu, A., Jin, Y., Yu, Y., Bai, J., Chen, D., Gendron, C., et al. (2010). Dynamic changes of territories 17 and 18 during EBV-infection of human lymphocytes. *Mol Biol Rep* 37, 2347–2354.

MacNeil, A., Sumba, O.P., Lutzke, M.L., Moormann, A., and Rochford, R. (2003). Activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*. *Br J Cancer* 88, 1566–1569.

Mannucci, S., Luzzi, A., Carugi, A., Gozzetti, A., Lazzi, S., Malagnino, V., Simmonds, M., Cusi, M.G., Leoncini, L., van den Bosch, C.A., et al. (2012). EBV Reactivation and Chromosomal Polysomies: *Euphorbia tirucalli* as a Possible Cofactor in Endemic Burkitt Lymphoma. *Advances in Hematology* 2012, 1–11.

Mawson, A.R., and Majumdar, S. (2017). Malaria, Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 141, 1849–1855.

Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., and Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet* 379, 1234–1244.

Moormann, A.M., and Bailey, J.A. (2016). Malaria - how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Curr Opin Virol* 20, 78–84.

Moquin, S.A., Thomas, S., Whalen, S., Warburton, A., Fernandez, S.G., McBride, A.A., Pollard, K.S., and Miranda, J.L. (2018). The Epstein-Barr Virus Episome Maneuvers between Nuclear Chromatin Compartments during Reactivation. *J Virol* 92.

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

Münz, C. (2019). Latency and lytic replication in Epstein–Barr virus-associated oncogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 17, 691–700.

Murata, T., and Tsurumi, T. (2014). Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Rev Med Virol* 24, 142–153.

Nijland, M., Kersten, M.J., Pals, S., Bemelman, F., and ten Berge, I. (2016). Epstein-Barr Virus–Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplantation Direct* 2, e48.

Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* 118, 431–438.

Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028–1038.

Robbiani, D.F., Deroubaix, S., Feldhahn, N., Oliveira, T.Y., Callen, E., Wang, Q., Jankovic, M., Silva, I.T., Rommel, P.C., Bosque, D., et al. (2015). Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma. *Cell* 162, 727–737.

Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.H.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012). Close Proximity to Igh Is a Contributing Factor to AID-Mediated Translocations. *Molecular Cell*.

Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., and Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34, 287–291.

Roukos, V., Burman, B., and Misteli, T. (2013). The cellular etiology of chromosome translocations. *Curr Opin Cell Biol* 25, 357–364.

Saha, A., and Robertson, E.S. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology* 93.

- Saleh, K., Michot, J.-M., Camara-Clayette, V., Vassetzky, Y., and Ribrag, V. (2020). Burkitt and Burkitt-Like Lymphomas: a Systematic Review. *Curr Oncol Rep* 22, 33.
- Sall, F.B., Germini, D., Kovina, A.P., Ribrag, V., Wiels, J., Toure, A.O., Iarovaia, O.V., Lipinski, M., and Vassetzky, Y. (2018). Effect of Environmental Factors on Nuclear Organization and Transformation of Human B Lymphocytes. *Biochemistry (Mosc)* 83, 402–410.
- Sall, F.B., El Amine, R., Markozashvili, D., Tsfasman, T., Oksenhendler, E., Lipinski, M., Vassetzky, Y., and Germini, D. (2019). HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of *AICDA* in human B-lymphocytes from peripheral blood. *J Cell Physiol* 234, 15678–15685.
- Simsek, D., and Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 410–416.
- Sklyar, I., Iarovaia, O.V., Gavrilov, A.A., Pichugin, A., Germini, D., Tsfasman, T., Caron, G., Fest, T., Lipinski, M., Razin, S.V., et al. (2016). Distinct Patterns of Colocalization of the *CCND1* and *CMYC* Genes With Their Potential Translocation Partner *IGH* at Successive Stages of B-Cell Differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 117, 1506–1510.
- Soni, A., Siemann, M., Pantelias, G.E., and Iliakis, G. (2015). Marked contribution of alternative end-joining to chromosome-translocation-formation by stochastically induced DNA double-strand-breaks in G2-phase human cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 793, 2–8.
- Thorley-Lawson, D.A. (2015). EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 151–209.
- Torgbor, C., Awuah, P., Deitsch, K., Kalantari, P., Duca, K.A., and Thorley-Lawson, D.A. (2014). A multifactorial role for *P. falciparum* malaria in endemic Burkitt's lymphoma pathogenesis. *PLoS Pathog* 10, e1004170.
- Tsai, M.-H., Raykova, A., Klinke, O., Bernhardt, K., Gärtner, K., Leung, C.S., Geletneky, K., Sertel, S., Münz, C., Feederle, R., et al. (2013). Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep* 5, 458–470.
- Tsurumi, T., Fujita, M., and Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15, 3–15.
- Vogt, N., Dai, B., Erdmann, T., Berdel, W.E., and Lenz, G. (2017). The molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 58, 1530–1537.

Figures and figure legends

Figure 1

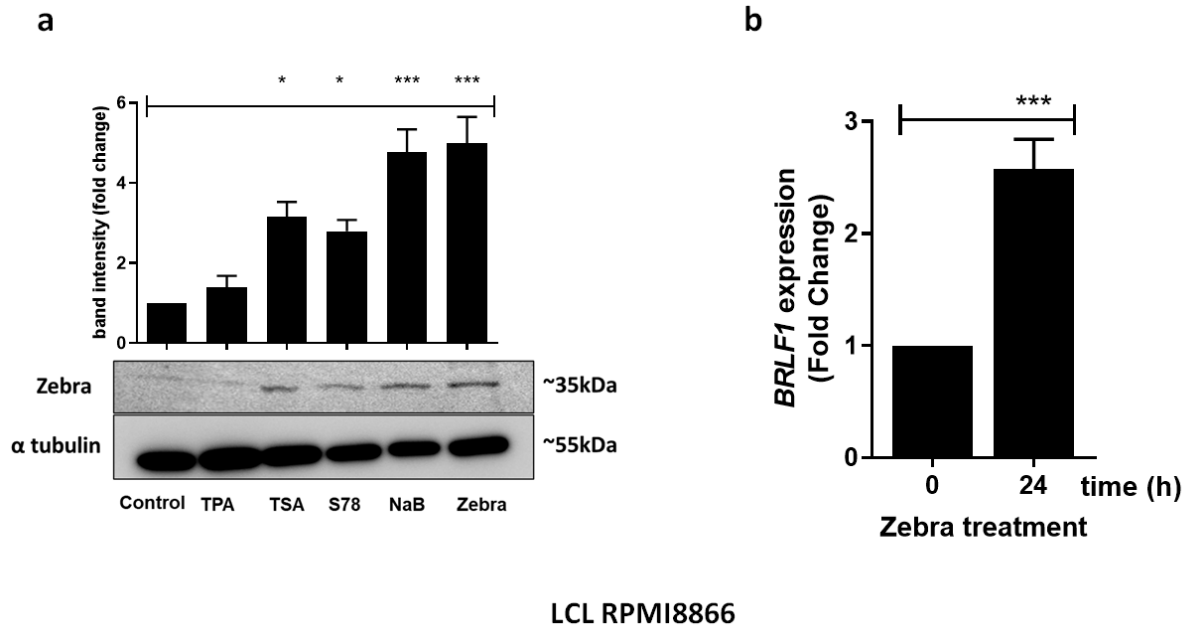


Figure 1: EBV lytic cycle induction in RPMI8866. **(a)** Bottom. A representative Western blot image of EBV immediate early protein Zebra expression. Cells were treated with different EBV lytic cycle inducers for 24h. Alpha tubulin was used as a loading control. TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TSA: Trichostatin A; S78: histone deacetylase inhibitor Abexinostat; NaB: sodium butyrate. Top. Graph showing the quantification of the Zebra bands intensity (bottom image) normalized to α -tubulin bands intensity. Results are represented as fold change of the intensity in treated cells compared with the intensity in untreated cells (control), set as 1. **(b)** EBV immediate early *BRLF1* gene expression analysis by qRT-PCR in cells treated with recombinant protein Zebra for 24h. Fold change expression is in comparison with *BRLF1* gene expression level in untreated RPMI8866 after normalization to *GAPDH* expression, set as 1. Data are plotted by mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test (a) or t-test (b). Results of three independent experiments are presented.

Figure 2

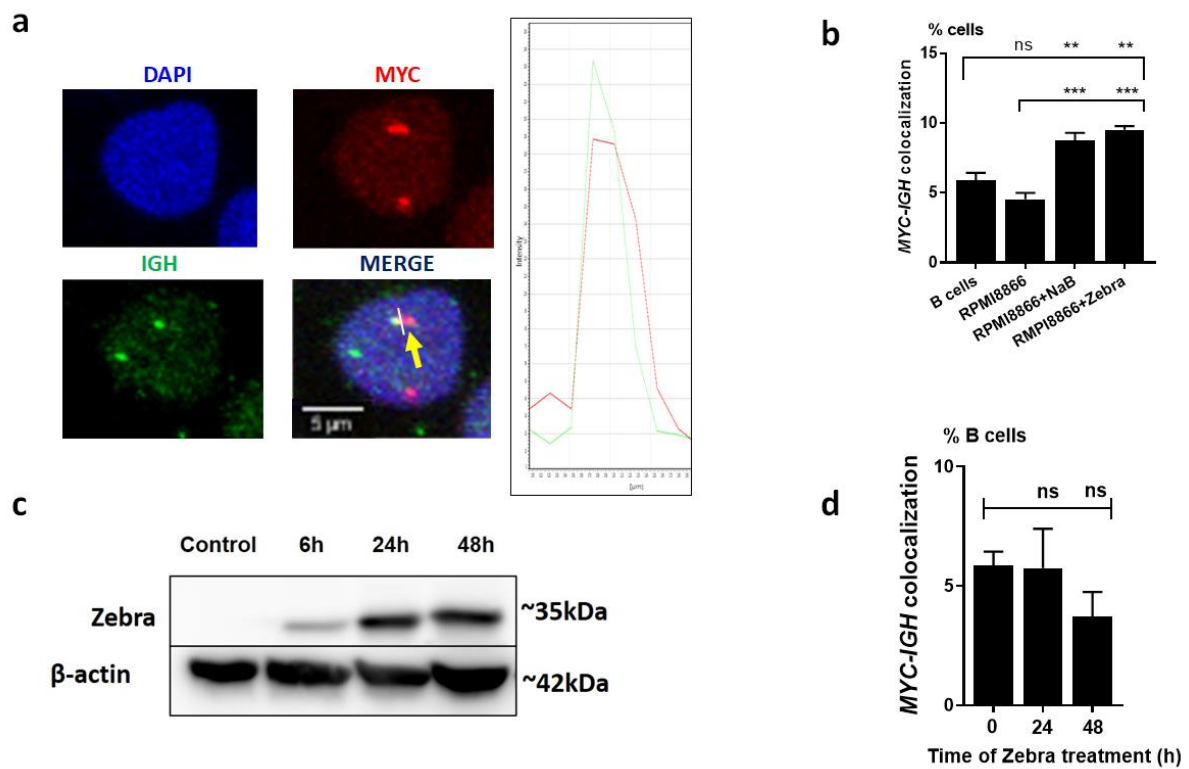


Figure 2: EBV reactivation in RPMI8866 induces *MYC-IGH* colocalization. **(a)** Representative optic section of a 3D-FISH image of RPMI8866 treated with an EBV lytic cycle inducer Zebra for 48h. Nuclei are stained with DAPI and represented in blue, *MYC* and *IGH* gene loci are stained with specific fluorescent probes and represented in red and green, respectively. Colocalization between *MYC* and *IGH* is highlighted by the yellow arrow. Scale bar = 5 μ m. The right panel illustrates *MYC* (red curve) and *IGH* (green curve) colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the MERGE picture, with the respective peak intensities (y-axis). **(b)** The proportion of cells with colocalized *MYC-IGH* signals (i.e. cells where the distance between the centers of corresponding FISH signals was less than 1 μ m) in EBV-negative B cells purified from healthy donors (B cells), latent EBV-positive RPMI8866 untreated or treated with sodium butyrate (NaB) or Zebra recombinant protein to induce lytic cycle. 3D-FISH was performed 48h after treatment. A minimum of 100 cells from at least two different experiments and two technical replicates were analyzed. **(c)** Kinetics western blot analysis of Zebra protein cell entry into EBV-negative B cells purified from healthy donors and treated with a recombinant Zebra at a concentration of 1 μ g/ml for the indicated time. Control, untreated B cells. **(d)** *MYC-IGH* colocalization rate in B cells purified from healthy donors and treated with the recombinant Zebra protein for the indicated time. 3D-FISH was performed 24h and 48h after treatment. A minimum of 180 cells from at least two different experiments and two technical replicates were analyzed. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ns: non-significant; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Figure 3

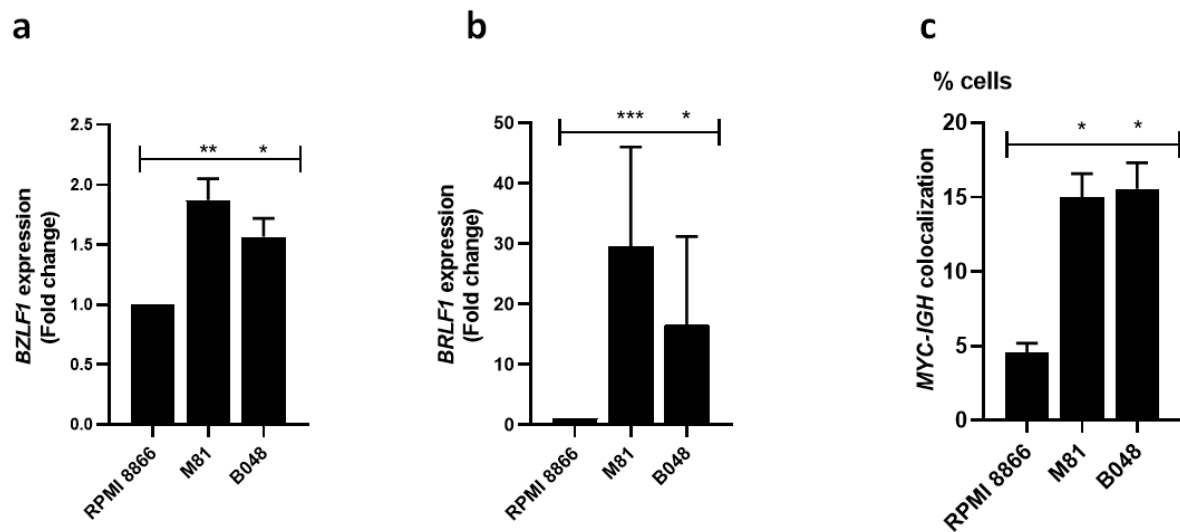


Figure 3: LCLs with a spontaneous EBV lytic activity show higher *MYC-IGH* colocalization rate. (a,b) Analysis of the expression of *BZLF1* (a) and *BRLF1* (b) by qRT-PCR in M81 and B048 cell lines with spontaneous EBV lytic activity. Expression is presented as fold change in comparison to a target gene expression in unstimulated RPMI8866 after normalization to *GAPDH* expression, set as 1. Data are from 3 experiments and 2 technical replicates for each. (c) *MYC-IGH* colocalization rate in M81 and B048 with spontaneous lytic activity, in comparison to RPMI8866. A minimum of 200 cells from at least two different experiments and two technical replicates were analyzed. All data are plotted by mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Figure 4

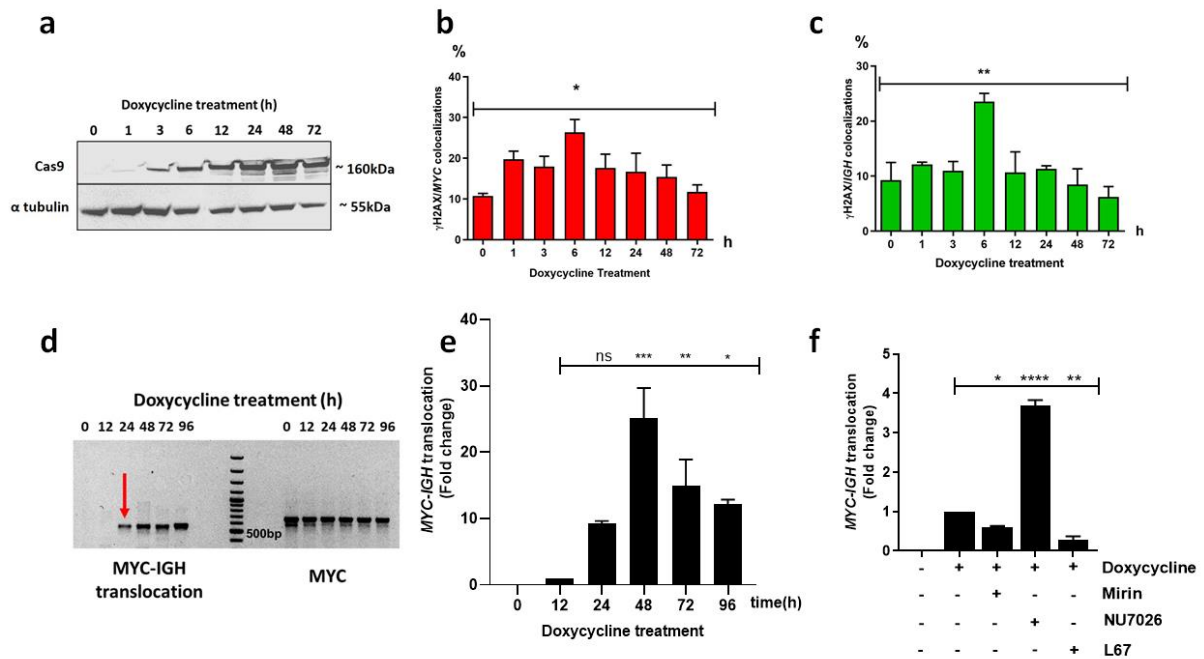


Figure 4: Characterization of the MYCIGHC9 cell line. **(a)** Representative image of a kinetic analysis of Cas9 expression upon Dox treatment performed by western blot. α -tubulin was used as a protein loading control. **(b, c)** Induction of DNA damage within the MYC and *IGH* loci after Cas9 expression. Cells were treated with Dox for the indicated times and 3D-FISH was performed with MYC and *IGH* probes followed by γ H2AX Immunofluorescence staining. Percentage of cells with colocalized γ H2AX foci with MYC **(b)** or *IGH* **(c)** loci was determined from at least 150 cells examined for each condition from at least two independent experiments. **(d, e)** Kinetics of MYC-*IGH* translocation formation after Dox treatment. Cells were treated with Dox for the indicated times and collected for DNA extraction and PCR followed by electrophoresis on agarose gel **(d)** or quantitative PCR **(e)** were performed. Fold changes in translocation t(8;14) rate in **(e)** are in comparison to translocation rate in cells treated with Dox for 12h (corresponding to the first time point with determined Ct values) after normalization to MYC, set as 1. Ct values were undetermined for untreated cells (0h). The data represent results are from three independent experiments with two technical replicates for each. **(f)** Effect of repair inhibitors on the MYC-*IGH* translocation rate. Cells were simultaneously treated with Dox and the indicated inhibitor for 24h and translocations were detected by qPCR. Translocation t(8;14) level fold changes are in comparison to t(8;14) level in Dox-treated cells after normalization to MYC, set as 1. The data represent results are from three independent experiments with two technical replicates for each. All data are plotted by mean $\pm$ SEM. ns, non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Figure 5

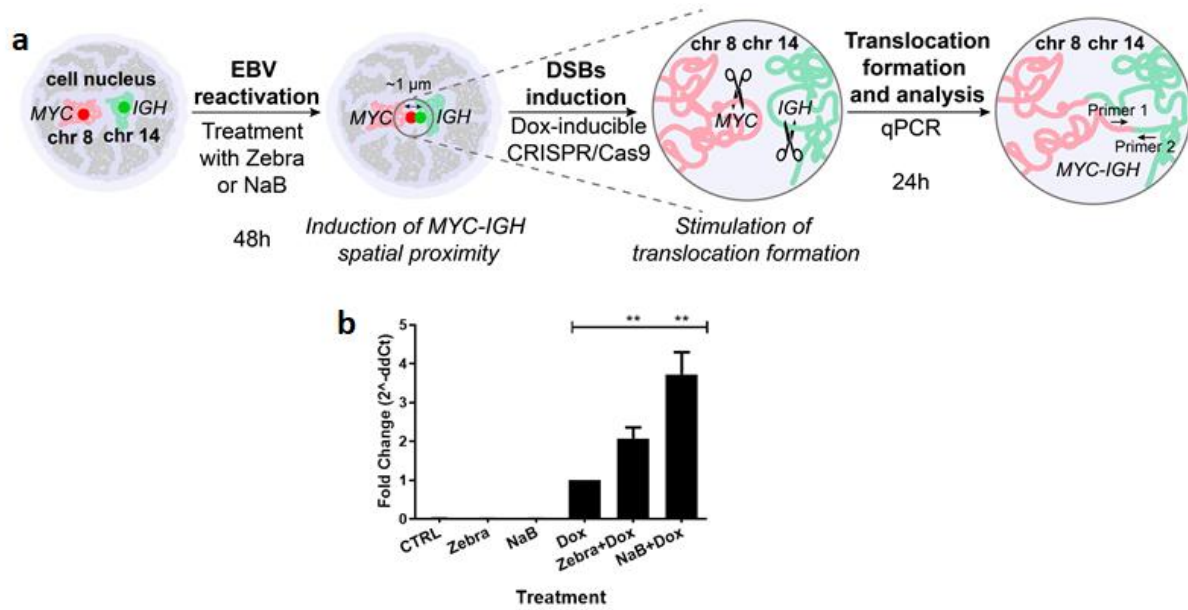


Figure 5: EBV reactivation-induced *MYC-IGH* spatial proximity leads to an increased t(8;14) rate when simultaneous double strand breaks occur on the target loci. **(a)** Experimental design. MYCIGHC9 line cells were treated or not with recombinant Zebra protein or sodium butyrate (NaB) for 48h to induce *MYC-IGH* proximity followed by Dox treatment for 24h and qPCR for *MYC-IGH* translocation detection. **(b)** qPCR for *MYC-IGH* translocation in Dox-treated cells after Zebra or NaB treatment. Fold changes in t(8;14) levels are in comparison to translocation rate in cells treated only with Dox after normalization to the *MYC* gene expression, set as 1. The data represent results are from three independent experiments with two technical replicates for each. Data are presented as mean $\pm$ SEM. ** $p < 0.01$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Figure 6

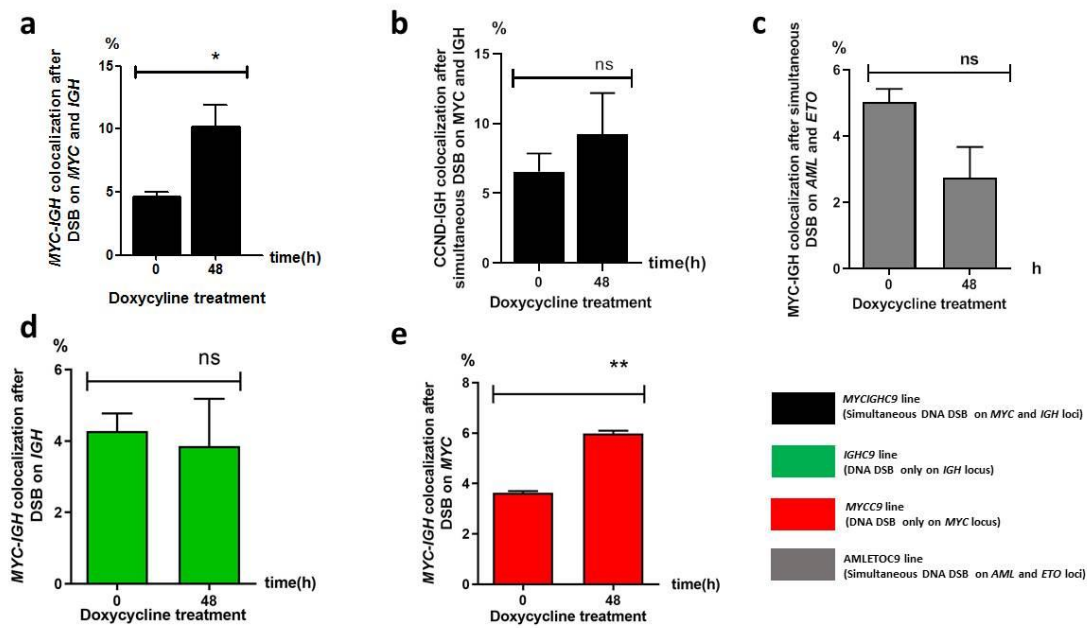


Figure 6: Specific DNA damage in the MYC locus favors *MYC-IGH* colocalization. **(a)** *MYC-IGH* colocalization rate in the MYCIGHC9 line. Cells were treated by Dox for 48h to induce Cas9 and gRNA expression. 3D-FISH was performed to evaluate *MYC-IGH* spatial proximity. **(b)** *CCND1-IGH* colocalization rate in the MYCIGHC9 line after Cas9-induced DSBs in the MYC and *IGH* loci. The same cells as in **(a)** were used to evaluate *IGH* proximity with *CCND1*. **(c)** *MYC-IGH* colocalization in the AMLETOC9 line after simultaneous Cas9 induced DSB within *AML* and *ETO* loci, two partners of translocation in acute myeloid leukemia. **(d)** *MYC-IGH* colocalization rate in IGHC9 line after Cas9 induced DSB on *IGH* locus. **(e)** *MYC-IGH* colocalization rate in the MYCC9 line after Cas9 induced DSB on *MYC* locus. A minimum of 85 cells from at least one experiment and at least three technical replicates were analyzed for each 3D FISH experiment. All data are plotted by mean $\pm$ SEM. ns, non-significant; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ as compared by t-test.

Figure 7

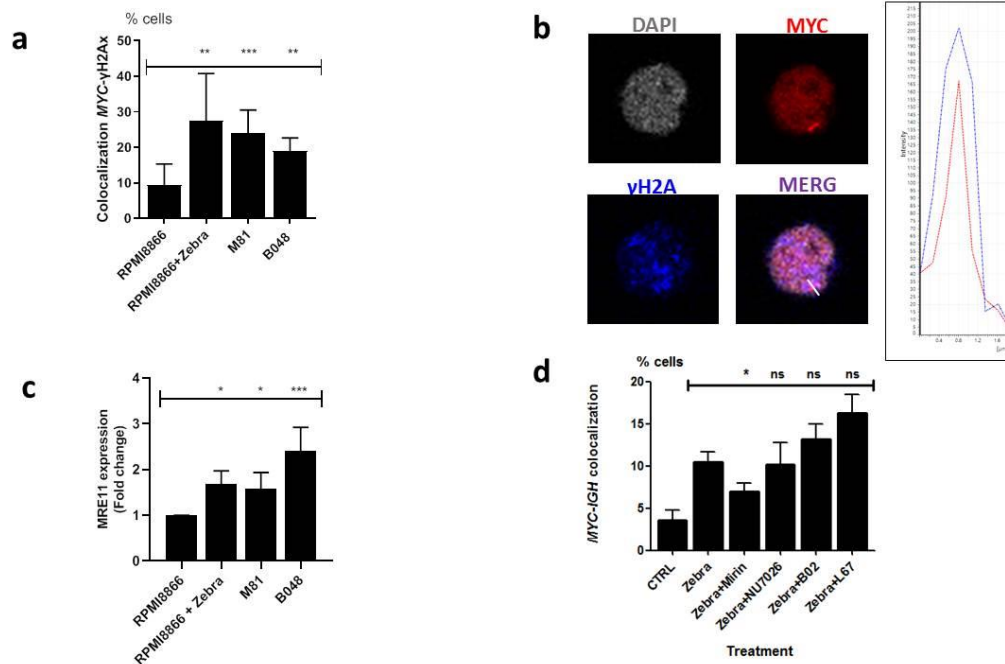


Figure 7: EBV reactivation induces DNA damage within the *MYC* locus and MRE11 is involved in *MYC* relocalization next to *IGH*. **(a)** DNA damage on *MYC* locus in LCLs with induced (RPMI8866+Zebra) or spontaneous (M81 and B048) lytic activity. Cells were processed for 3D-FISH followed by Immunostaining for γH2AX. Y axis, percentage of cells with colocalized γH2AX foci and *MYC* locus. A minimum of 380 cells from two experiments and least three technical replicates were analysed. **(b)** Representative slice-section of an immuno-3D FISH image with colocalized γH2AX foci (represented in blue) and *MYC* (in red). Scale bar = 5μm. The right panel illustrates *MYC* (red curve) and γH2AX (blue curve) colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the MERGE picture, with the respective peak intensities (y-axis), Scale bar = xμm. **(c)** *MRE11* expression analysed by qRT-PCR in LCLs with induced (RPMI8866+Zebra) or spontaneous (M81 and B048) lytic activity. *MRE11* expression fold changes upon EBV reactivation are in comparison with *MRE11* expression in RPMI8866 after normalization with *GAPDH* expression, set as 1. **(d)** *MYC-IGH* colocalization in RPMI8866 treated or not with recombinant Zebra protein for 48h, in association or not with the MRE11 inhibitor Mirin or the DNA-PK inhibitor NU7026 or the Rad51 inhibitor B02 or the LigaseIII inhibitor L67. A minimum of 100 cells from two experiments and least three technical replicates were analysed. All data are plotted by mean ± SEM. ns, non-significant; **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001; as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Supplementary Methods

1. EBV-positive B cell lines

RPMI8866 and PRIESS are human EBV-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). M81 and B048 (also named rMSHJ) (a kind gift from Henri-Jacques Delecluse (DKFZ, Heidelberg, Germany)) are LCLs with an enhanced spontaneous EBV lytic activity. EBV M81 strain was isolated from a Chinese patient with nasopharyngeal carcinoma (NPC). The B048 cell line was generated by infection of common marmoset peripheral B cells with an EBV virus isolated from a German stem cell transplant (SCT) recipient with increased EBV load (Delecluse et al., 2020; Tsai et al., 2013). All LCLs were cultured in RPMI 1640, supplemented with 10% fetal bovine serum, 2mM L-Glutamine, 1mM sodium pyruvate, 20mM glucose, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all reagents for cell culture were from Gibco®, Thermofisher scientific).

2. RPMI8866 cell line inducibly expressing CRISPR/Cas9 and guide RNAs targeting specific gene loci.

RPMI8866 cell line inducibly expressing CRISPR/Cas9 was created as follows. First, the guide RNAs (gRNAs) targeting *MYC*, *IGH*, *ETO* and *AML* genes were designed and cloned into the pHU6-gRNA plasmid (Addgene #53188). gRNAs efficacy was confirmed by the ENIT method (Germini et al., 2017a). The sequences of the selected gRNAs are listed in **Supplementary table 1**. Then the gRNAs were amplified, purified, and cloned by the Sall restriction enzyme site into Puro_Cas9 donor plasmid (Addgene #58409). The final plasmids containing the cassette of the selected gRNA(s), the Cas9 gene and the puromycin resistance gene (Puro-Cas9_gRNA(s) plasmid), were assembled using Gibson Assembly Master Mix kit (NEB, USA).

The RPMI8866 cells were co-electrotransfected with the generated Puro-Cas9_gRNA(s) plasmid, a Tet-inducible Cas9 gene + AAVS1-Neo-M2rtTA plasmid (Addgene, #60843) and two TALEN plasmids for cutting in the safe-harbor site (AAVS1-TALEN-L+ AAVS1-TALEN-R) (Addgene # 59025 and # 59026) using a protocol developed in our laboratory (Canoy et al., 2020). Then the cells were maintained in the RPMI 1640 medium, supplemented with 10% certified tetracycline-free fetal bovine serum (Takara, Japan), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 800 µg/ml G418 antibiotic. Resistant cells were cloned *via* finite dilution technique in a 96-well plate. Clones and bulk lines were grown with and without 1 µg/ml doxycycline (Dox) for 48h and then tested for the presence of specific translocations.

Using this technology, we generated four different cell lines expressing gRNAs targeting both *MYC* and *IGH*; *MYC* only; *IGH* only and both *AML* and *ETO* loci named MYCIGHC9, MYCC9, IGH C9 and AMLETOC9, respectively. All cells were cultured as described above.

3. Primary human B cell isolation

Whole blood samples from healthy donors of different sex and age were obtained from the “Etablissement Français du Sang”, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. In agreement with French law, the study was registered as a non-interventional study at the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (2016-A01316-45) and an informed consent was obtained from all subjects. B cells were purified from peripheral blood by negative selection using the Magnisort B cell enrichment kit II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA) after PBMC isolation by Ficoll density gradient centrifugation. These B cells were considered as EBV-negative B cells as even in case of EBV-positive healthy donors, the probability of encountering an EBV positive circulating B cell is extremely low: $1\text{-}50/10^6$ cells during latency or $1\text{-}10/10^3$ cells during lytic phase (Nijland et al., 2016). At most 400 B cells were analysed for 3D-FISH.

4. Cell treatment

Cells were treated or not with specific substances at concentrations listed in **Supplementary Table 2** for indicated time before being collected and processed for the different experiments.

5. Western Blot

Approximately 10^7 cells were collected at indicated time points by centrifugation (10 minutes 1000 g). Cell pellet was then resuspended in 150 μl of NETN buffer (NaCl 150mM, EDTA 1mM, Tris pH 7.5 50mM, NP40 0.5%, protease inhibitor cocktail (Roche)). Resuspended cells were then sonicated 10 seconds at 30% of intensity to completely lyse cells using a Vibra Cell sonicator (Newtown, CT, USA) and incubated on ice for 30 minutes. Cell lysates were then centrifuged at 4° at maximum speed for 10 minutes. Supernatants were aliquoted and stored at -80°C . Proteins were quantified using the Pierce™ BCA Protein Assay Kit and the Nanodrop (Thermo scientific).

Thirty micrograms (μg) of protein were loaded onto a 4-12% SDS-PAGE precast gel (Invitrogen) in the MOPS running buffer (Invitrogen), run at 80V for 30 minutes and then 180V for 1 hour and transferred onto a PVDF membrane (GE healthcare, USA) at 90V at 4° for 2 hours in transfer buffer (0.025M Tris, 0.192M Glycine, 20% ethanol). The membrane was then blocked with 5% milk in TBST buffer (Tris-buffered saline, 0.1% Tween-20) for 1h at room temperature (RT) before an overnight incubation with specific primary antibodies at 4°C . The following day membranes were washed with TBST buffer three times (5 minutes each) and incubated for 1h at RT with a secondary HRP-conjugated antibody. After three washes with TBST, the membrane was incubated with Immobilon® Western Chemiluminescent HRP substrate (Merck-Millipore, USA) reagent before exposure and revelation. Western blot band intensity quantification was performed using ImageJ software. The band intensity of the target protein was always normalized to the band intensity of the loading control protein. The following primary antibodies were used: mouse anti-Cas 9 (Santa Cruz) at a concentration of 1:200; mouse anti-Zebra (a kind gift from Emmanuel Drouet, Université Grenoble Alpes, France) at a concentration of 1:1000, rabbit anti- α -tubulin (Santa Cruz) at a concentration of 1:1000 and mouse anti- β -actin (Santa Cruz) at a concentration of 1:1000. Anti-rabbit or anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies were used at a concentration of 1:2500 (Invitrogen).

6. Quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted using Nucleospin® RNA II purification kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. cDNA synthesis was performed as previously described (Sall et al., 2019). QPCR amplification was performed using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) with the following cycling conditions: 1 cycle of 50°C (2mn) + 95°C (2mn); 40 cycles 95°C (15s) + 60°C (1mn) + 72°C (1mn) and 1 cycle 72°C (10mn). Primer sequences are listed in **Supplementary Table 3**. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used for comparative expression analysis of target genes with normalization to *GAPDH*. Comparison of expression was done between untreated RPMI8866 cells (control) and treated ones; or between RPMI8866 cells and M81 and B048 cells. RPMI8866 gene expression levels were set to 1.

7. Quantitative PCR

Total DNA was extracted using Nucleospin® Tissue DNA purification (MACHEREY-NAGEL) according to the manufacturer's protocol. DNA was quantified by Nanodrop (Thermo scientific). Five hundred ng of genomic DNA were amplified using *MYC* and *IGH* specific primers designed surrounding the DNA breakpoints for translocation detection and, as a control, specific *MYC* primers designed ~6.5 kbp downstream from the breakpoint sequence. PCR amplification was performed using the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific) using the following program: 1 cycle of 50°C (2mn) + 95°C (2mn); 40 cycles 95°C (15s) + 60°C (1mn) + 72°C (1mn) and 1 cycle 72°C (10mn). Primer sequences are listed in **Supplementary Table 3**. PCR products were loaded on 1% agarose gel and migrated by electrophoresis for amplicon visualization. For quantification of the translocation rate, the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used. Translocation expression was first normalized to *MYC* expression and then compared to 12h time point for Dox kinetics experiment and cells treated only with Dox when studying the translocation level variation after EBV reactivation. Translocation level was set to 1 for all controls.

8. Estimation of the CRISPR/Cas9-induced t(8;14) rate

The rate of the CRISPR/Cas9-induced t(8;14) was estimated 24 hours after Dox treatment by $\Delta Ct = 7.914$ of *MYC-IGH* and *MYC* amplicons. The value gave us a rough estimation that per each *MYC* locus there are $2^{-7.914}$ specific *MYC-IGH* translocations or $2^{-6.914} = 8.3 \times 10^{-3}$ per 1 cell or 1 translocation in 120 cells. The estimation assumes that all cells are in G1, each cell has 2 *MYC* loci, and that primers' efficiencies are equal to 2.

9. 3D-FISH and Immuno-3D FISH

Hybridization and staining of human chromosome loci 8q24 (*MYC* gene locus), 14q32 (*IGH* gene locus) and 11q13 (*CCND1* gene locus) were performed using "RainbowFISH" probes (Empire Genomics, Buffalo, NY, USA). *MYC* and *CCND1* were labelled with Spectrum Orange and *IGH* with Spectrum Green. 3D-FISH was performed as previously described (Germini et al., 2017a). For immuno-3D-FISH, cells were immuno-stained after 3D-FISH with rabbit anti-histone H2AX phospho-Ser139 (γH2AX) (Active Motif) or rabbit anti-53BP1 (Abcam). Alexa-

633 anti-rabbit antibody (Invitrogen) was used as a secondary antibody. Nuclei were counterstained with DAPI diluted 1:1000 in the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

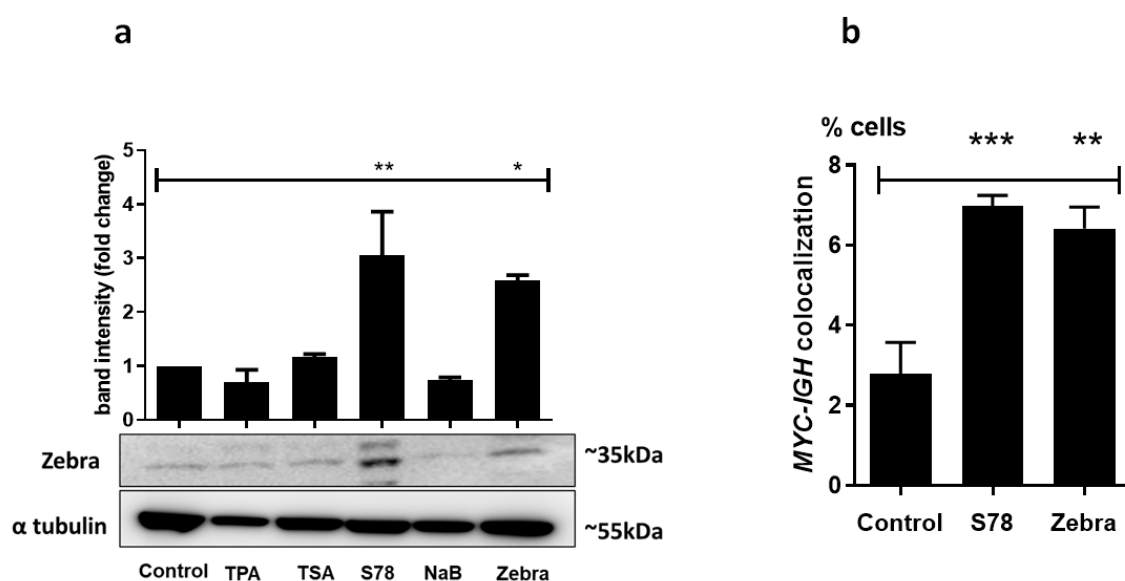
10. Image acquisition and analysis

Multiphoton SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Berlin, Germany) with a 63X oil immersion objective was used for 3D FISH and Immuno-3D FISH images acquisition. Z-stacks were acquired using a frame size of 1024×1024 , and $0.5\mu\text{m}$ z-steps, with sequential multitrack scanning using the 405, 488, 543, 633 nm laser wavelengths. For *MYC-IGH* and *CCND1-IGH* colocalization, Imaris software (Bitplane) was used. The colocalization rate corresponded to the percentage of cells where at least one *MYC* or *CCND1* locus was located $1\mu\text{m}$ or less from one *IGH* locus. The LEICA Application Suite X (Leica Microsystems) software was used to evaluate the percentage of cells that have colocalized γH2AX or 53BP1 foci with *MYC* and/or *IGH*.

11. Statistics

All statistical tests were performed using the Graphpad Prism 5 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA). One-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni's post-test or Student's t-test was used to compare averages between different groups. Data are presented as mean $\pm$ standard error of mean (SEM).

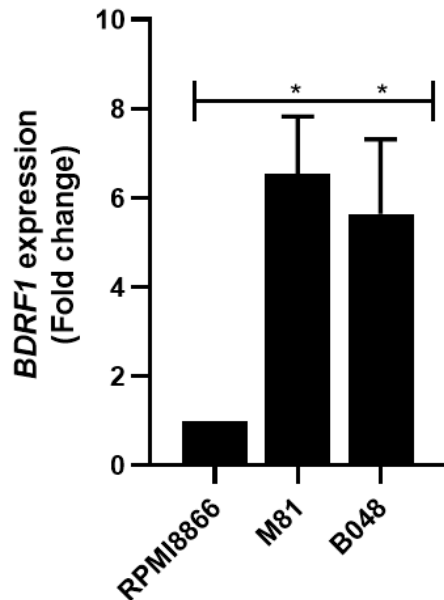
Supplementary Figure 1



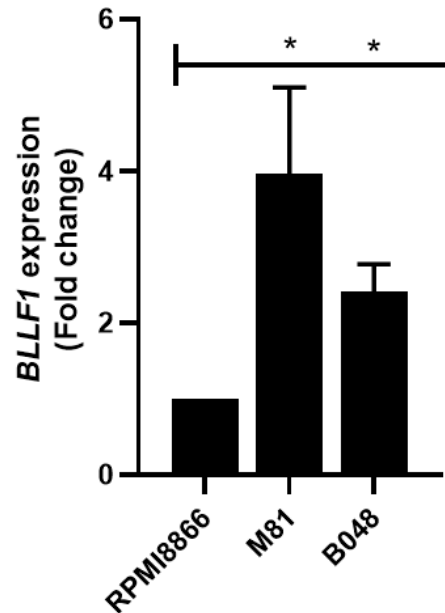
Supplementary Figure 1: EBV lytic cycle induction in lymphoblastoid cell line PRIESS. **(a)** EBV immediate early protein Zebra expression detected by western blot (bottom panels) after cell treatment with different EBV lytic cycle inducers for 24h. Zebra bands intensity (top panels) of three replicates were quantified and normalized to α -tubulin. Fold changes of bands intensity are compared to band intensity of untreated cells (Control), set as 1. **(b)** MYC-IGH colocalization in LCL PRIESS untreated or treated with S78 or Zebra recombinant protein to induce lytic cycle. 3D-FISH was performed 48h after treatment (24H after EBV reactivation). A minimum of 100 cells from at least two different experiments were analyzed. TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate; TSA: Trichostatin A; S78: histone deacetylase inhibitor Abexinostat; NaB: sodium butyrate. Data are plotted by mean $\pm$ SEM. * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001 as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Supplementary Figure 2

a

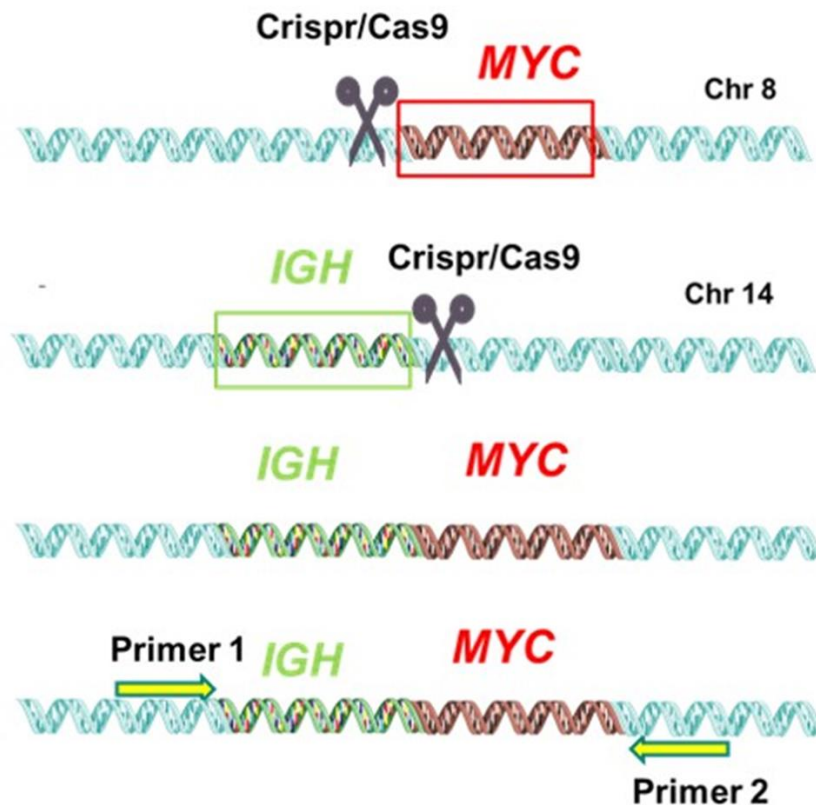


b



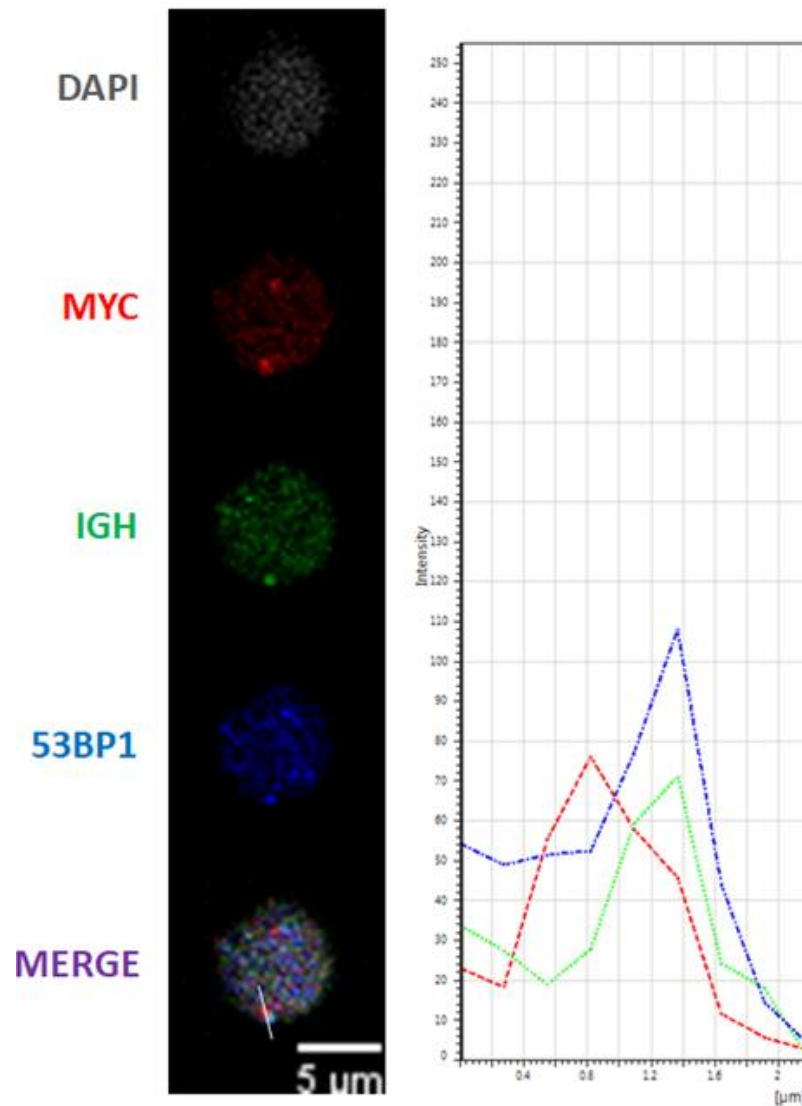
Supplementary Figure 2: M81 and B048 show a spontaneous EBV lytic activity. qRT-PCR analysis of expression of two EBV late genes, *BDRF1* (**a**) and *BLLF1* (**b**) in cells with spontaneous EBV lytic activity M81 and B048. Fold changes of gene expression of M81 and B048 cells are in comparison to expression in RPMI8866 after normalization to *GAPDH* expression, set as 1. Results from three independent experiments and two technical replicates are presented. Data are plotted as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$; as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Supplementary Figure 3



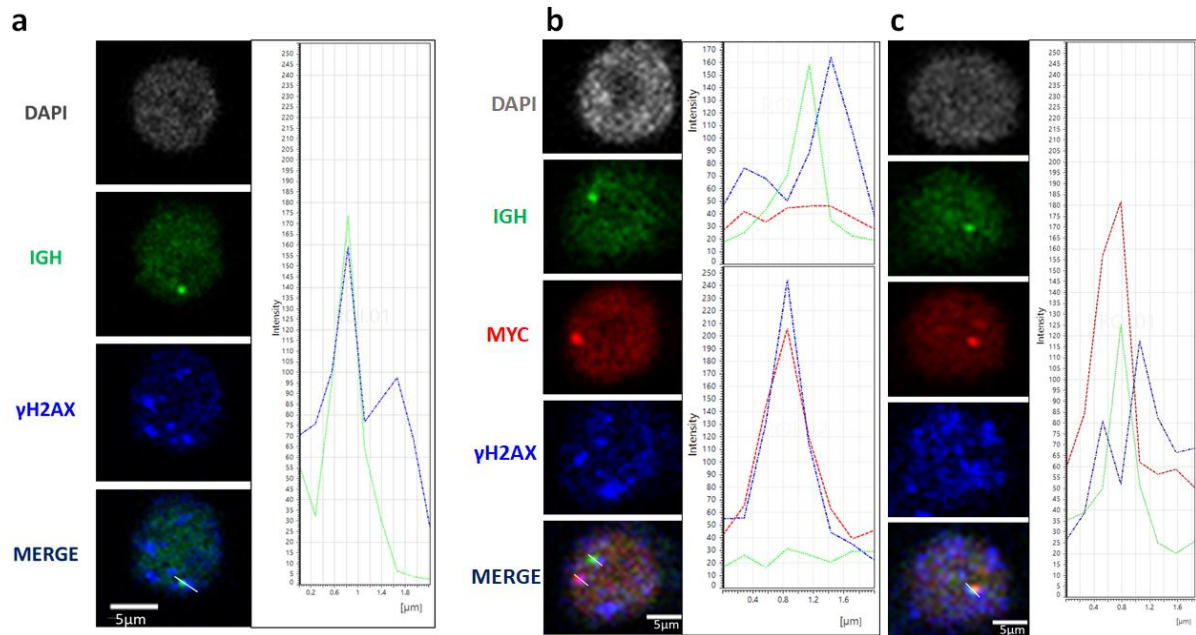
Supplementary Figure 3: Generation of chromosomal translocations in the the MYCIGHC9 cell line: RPMI8866- derived MYCIGHC9 cell line harbours plasmid coding for Cas9 (represented by scissors) coupled with two guide RNA targeting specifically *MYC* on chromosome 8 (red) and *IGH* on chromosome 14 (green). Cas9 and gRNA expression can be induced by Dox and then leads to the appearance of DSBs in the *MYC* and *IGH* loci. This leads to appearance in some cells of the *MYC-IGH* translocation that can be detected by PCR using specific primer pairs surrounding the breakpoint.

Supplementary Figure 4



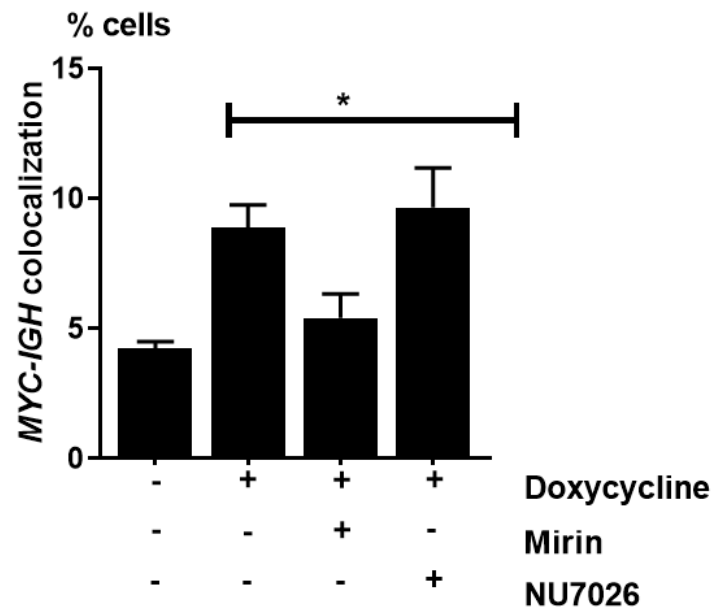
Supplementary Figure 4: MYC, IGH colocalize in the same DNA repair factory. *MYC-IGH-53BP1* colocalization rate in the *MYCC9* line after Cas9 induced DSB on *MYC* locus. (h) Representative slice-section of an immuno-3D FISH image with colocalized 53BP1 foci (represented in blue), *MYC* (in red) and *IGH* (in green). Scale bar = 5μm. The right panel illustrates *MYC* (red curve), *IGH* (green curve) and γH2AX (blue curve) colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the MERGE picture, with the respective peak intensities (y-axis).

Supplementary Figure 5



Supplementary Figure 5: EBV reactivation increases DNA damage within *IGH* locus and promotes simultaneous *MYC*-*IGH* double strand break. **(a)** Representative slice-section of an immuno-3D-FISH image of *IGH* (green) and γ H2AX foci (blue) colocalization. The right panel illustrates *IGH* (green curve) and γ H2AX (blue curve) colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the MERGE picture, with the respective peak intensities (y-axis). Scale bar = 5 μ m. **(b-c)** Simultaneous DNA damage on *MYC* and *IGH* within the same cell. In **(b)**, colocalization *IGH*- γ H2AX and *MYC*- γ H2AX separately with their respective illustrative graph (top = *IGH* (green curve) and γ H2AX (blue curve); bottom = *MYC* (red curve) and γ H2AX (blue curve)). In **(c)**, simultaneous colocalization *MYC*-*IGH*- γ H2AX with the corresponding illustrative graph (right panel). Scale bar = 5 μ m

Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 6: MYC-IGH colocalization in MYCIGHC9 line treated or not with Dox for 48h, in association or not with the MRE11 inhibitor Mirin or DNA-PK inhibitor NU7026. A minimum of 90 cells from at least two different experiments were analyzed. Data are plotted by mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$ as compared by ANOVA, Bonferroni's post-test.

Supplementary Table 1: gRNA sequences

Target	Sequence 5'->3'
<i>AML</i>	GACTCCCCCATGTACCCCTA
<i>ETO</i>	GATGTAAGAGGAAGCAGCTT
<i>IGH</i>	GAGAACATACCAAGCCCCAC
<i>MYC</i>	TGCACCTCGGACGCTCCTGC

Supplementary Table 2: Cell treatments

Substance	Function	Used for	Working concentration
Recombinant Zebra protein (obtained from BiologicsCorp, USA)	EBV immediate early protein	EBV reactivation in LCLs	1 µg/mL
Sodium Butyrate (NaB), Sigma-Aldrich	HDAC inhibitor		2.5 µM
Trichostatin A (TSA), Calbiochem			6.6 µM
Abexinostat (S78)			100 nM
12-O tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), Sigma Aldrich	Activator of the cellular protein kinase C		8 nM
Mirin, Calbiochem	MRE11 inhibitor	DNA repair inhibition	25 µM
NU7026, Sigma Aldrich	DNA-PK inhibitor	Classical NHEJ inhibition	20 µM
B02, Calbiochem	Rad51 inhibitor	Homologous recombination inhibition	6.25 µM
L67, Sigma Aldrich	DNA ligase I and III inhibitor	Alternative NHEJ inhibition	25 µM
Doxycycline, Sigma Aldrich	Activator of doxycycline-inducible promoter	CRISPR/Cas9 and gRNAs expression induction	1 µg/ml

Supplementary Table 3: Primer sequences

Target gene	Sequence 5'->3'	Annealing temperature (°C)
<i>MYC</i> (translocation primer)	AGGAGGTGGCTGGAACTTGT	60
<i>IGH</i> (translocation primer)	TCCCCTCCCTTCTGAGTCTGC	
<i>MYC</i> F (~6.5 kbp downstream the breakpoint)	AAGGTCAGAGTCTGGATCAC	
<i>MYC</i> R (~6.5 kbp downstream the breakpoint)	TAACCTTGGGGGCCTTT	
<i>BZLF1</i>-b F	AAATTTAAGAGATCCTCGTGTAACATC	
<i>BZLF1</i>-b R	CGCCTCCTGTTGAAGCAGAT	
<i>BRLF1</i>-b F	CAAACAGACGAGATGAGGC	
<i>BRLF1</i>-b R	GCGGTGCCTGGTGGCAGG	

<i>BDRF1</i> F	CGGAGTGGCTCAGTCTAAGG	
<i>BDRF1</i> R	AGGTGGGCTGACACAGACTT	
<i>BLLF1</i> F	AGAATCTGGGCTGGGACGTT	
<i>BLLF1</i> R	ACATGGAGCCCGGACAAGT	
<i>MRE11</i> F	CCAGAGAAGCCTCTTGTACG	
<i>MRE11</i> R	TTCCACCTCTTCGACCTCTTC	
<i>GAPDH</i> F	CTGCACCACCAACTGCTTAG	
<i>GAPDH</i> R	AGGTCCACCACTGACACGTT	

2. Position des loci *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B d'enfants Sénégalais infectés par le virus EBV

A la suite des résultats obtenus *in vitro*, nous avons voulu étudier la position des loci *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B circulants d'enfants africains vivant dans les régions géographiques incluses dans la « ceinture du Lymphome » représentée en noir dans la figure 32. Nous avons choisi le Sénégal, un pays situé à l'extrême ouest du continent Africain et appartenant à cette ceinture du Lymphome (indiqué par le cercle rouge de la figure 29).

Dans ces régions, ces enfants sont très précocement infectés par le virus EBV et en même temps exposés de façon chronique et répétée à d'autres facteurs qui favorisent la réactivation du virus dans leurs lymphocytes B infectés. Les plus connus sont *P. falciparum*, le latex de la plante *E. tirucalli* et l'exposition à l'AFB1. Nous avons recruté des enfants à Dakar, la capitale Sénégalaise et des prélèvements sanguins ont été effectués pour la sérologie EBV et l'étude de la position des loci *MYC* et *IGH* par 3D-FISH. Nous avons dans un premier temps comparé le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B de ces enfants vivant en zone d'endémie, à ceux de donneurs sains européens. Dans un second temps, nous avons comparé le taux de colocalisation *MYC- IGH* dans les lymphocytes B entre les enfants en fonction de leur statut sérologique.



Figure 29: Ceinture africaine du lymphome: Zone géographique de distribution du Lymphome de Burkitt Endémique
Selon (Magrath, 2012)

2.1. Caractéristiques épidémiologiques, cliniques et profil sérologique des enfants inclus

Au total, 25 enfants âgés entre 2 et 15 ans ont été recrutés aux services de Pédiatrie des Centres Hospitaliers Universitaires Aristide Le Dantec et Abass Ndao de Dakar (Sénégal) après le consentement de leur parent ou tuteur légal. L'âge moyen était de 8ans $\pm$ 3ans. Il s'agissait d'enfants reçus en consultation ou hospitalisés pour une pathologie bénigne, en dehors de toute suspicion d'hémopathie maligne ou d'autres néoplasies. La sérologie EBV effectuée a permis de les classer en différents groupes selon le profil des anticorps. L'intensité de la bande de positivité sur les cassettes a été arbitrairement quantifiée de 1+ à 4++++ en comparaison avec la bande C contrôle. Vingt-quatre sur les 25 enfants recrutés avaient une sérologie positive, soit 96% de la cohorte. Un seul enfant avait une sérologie négative, il s'agissait du plus jeune de la cohorte et était âgé de 2 ans. Sur les 24 enfants avec une sérologie positive, 15 étaient en phase de latence et 7 en phase de convalescence ou réactivation. Un enfant (#2) présentait une présence isolée d'IgM anti-VCA/Zebra suggérant un profil de primo-infection très précoce. Un autre enfant (#14) avait également un profil atypique avec présence isolée des IgG anti-VCA faisant évoquer le début de la période de transition entre la primo-infection et la phase de latence c'est-à-dire la convalescence. Un seul enfant (#4) présentait une positivité des 3 anticorps avec une forte intensité, plus compatible avec une réactivation qu'une phase de convalescence. Le tableau XII résume les caractéristiques épidémiologiques, le diagnostic et le profil sérologique des enfants.

Tableau XI: Profil épidémiologique, clinique et sérologie EBV des enfants

Patient #	Age (années)	Sexe	IgM anti-VCA/Zebra	IgG anti-VCA	IgG anti-EBNA1	Stade de l'infection à EBV	Diagnostic clinique
1	10	M	+	+++	++	Convalescence ou Réactivation	Syndrome néphrotique
2	2	F	-	-	-	Absence d'infection	Bronchite aiguë
3	12	M	+	+++	++	Convalescence ou Réactivation	Intoxication
4	4	M	+++	+++	++	Réactivation	Pneumonie
5	15	F	-	++	+++	Latent infection	Cardiopathie rhumatismale
6	4	M	+	-	-	Primo-infection	Syndrome néphrotique
7	7	M	+	++	+	Convalescence ou Réactivation	Syndrome néphrotique
8	8	F	-	++	+++	Infection latente	Diabète
9	12	F	-	++++	+	Infection latente	Infection à VIH1
10	10	M	+	++	++	Convalescence ou Réactivation	Tuberculose ganglionnaire
11	12	M	-	+++	+++	Infection latente	GNA post-streptococcique
12	7	M	-	+++	+++	Infection latente	BPO pour Hydrocèle
13	10	F	+	++	+++	Infection latente	BPO pour Hernie
14	7	M	-	++	-	Convalescence ou Infection latente	Amblyopie
15	7	M	-	++	+++	Infection latente	BPO pour fistule urétéro-cutanée
16	7	F	-	++	+++	Infection latente	Pneumonie
17	7	M	+	+	+++	Convalescence ou Réactivation	BPO
18	8	M	-	++	+++	Infection latente	Acido-cétose diabétique
19	5	M	-	+++	++	Infection latente	Acido-cétose diabétique
20	14	M	-	++	+	Infection latente	Acido-cétose diabétique
21	14	M	+	++	++	Convalescence ou Réactivation	Diabète
22	4	F	-	+++	+++	Infection latente	Infection urinaire
23	11	F	-	++	+	Infection latente	Diabète
24	4	F	-	++	+	Infection latente	Tuberculose
25	5	M	-	+++	+++	Infection latente	Crise d'épilepsie

BPO : Bilan préopératoire ; GNA : Glomérulonéphrite aiguë, VCA : Antigène de capsid virale ; EBNA : Antigène Nucléaire du virus d'Epstein-Barr

2.2. Colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B circulants des enfants

A partir d'un prélèvement de sang veineux périphérique, les lymphocytes B des enfants ont été purifiés puis fixés sur lamelle pour une 3D-FISH. Le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les cellules a été évalué chez les 11 premiers enfants. La comparaison du taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B de donneurs européens avec ceux des enfants sénégalais indépendamment de leur statut sérologique retrouvait une moyenne significativement plus élevée chez les enfants (Figure 30B). Cependant, les deux populations n'ont pas la même tranche d'âge, et en plus les enfants étaient suivis pour des pathologies alors que les donneurs européens étaient supposés être sains. Cette différence ne peut donc pas seulement être attribuée à la différence entre les régions géographiques. Aussi, considérant que 90% des adultes sont infectés par EBV, nous pouvons extrapoler et assumer que 9 donneurs européens sur 10 avait une sérologie positive et donc cette différence entre enfant sénégalais et donneurs européens n'était probablement pas en rapport avec une sérologie EBV positive ou négative. En revanche, elle pourrait être liée au profil sérologique de latence ou réactivation. Nous avons alors par la suite comparer les enfants entre eux en fonction de leur statut sérologique EBV : absence d'infection, infection latente, primo-infection/réactivation. Sur les 11 enfants analysés, seul 1 enfant n'était pas infecté (Patient#2) ; 6 avaient un profil de primo-infection ou réactivation (# 1, 3, 4, 6, 7 et 10) et 4 un profil d'infection latente (#5, 8, 9 et 11). L'objectif de cette expérience était de vérifier si conformément à nos résultats précédemment décrits *in vitro*, le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B des enfants serait plus élevé dans le groupe en phase de réactivation. Pour chaque enfant, au moins 200 lymphocytes B sur différents champs microscopiques ont été analysés, soit au total au moins 400 signaux de *MYC* et 400 signaux d'*IGH*. Contrairement aux résultats attendus, nous n'avons pas retrouvé de différences significatives entre les trois groupes d'enfants (Figure 30B). La petite taille de l'échantillon pourrait-être évoquée pour expliquer ces résultats. Cependant, les résultats obtenus *in vitro* après traitement des cellules B avec une protéine recombinante Zebra suggèrent que la présence du virus dans les cellules était nécessaire pour l'induction d'une colocalisation entre les deux loci. Ainsi, il serait plus pertinent d'étudier la colocalisation *MYC-IGH* uniquement dans les cellules EBV-positives.

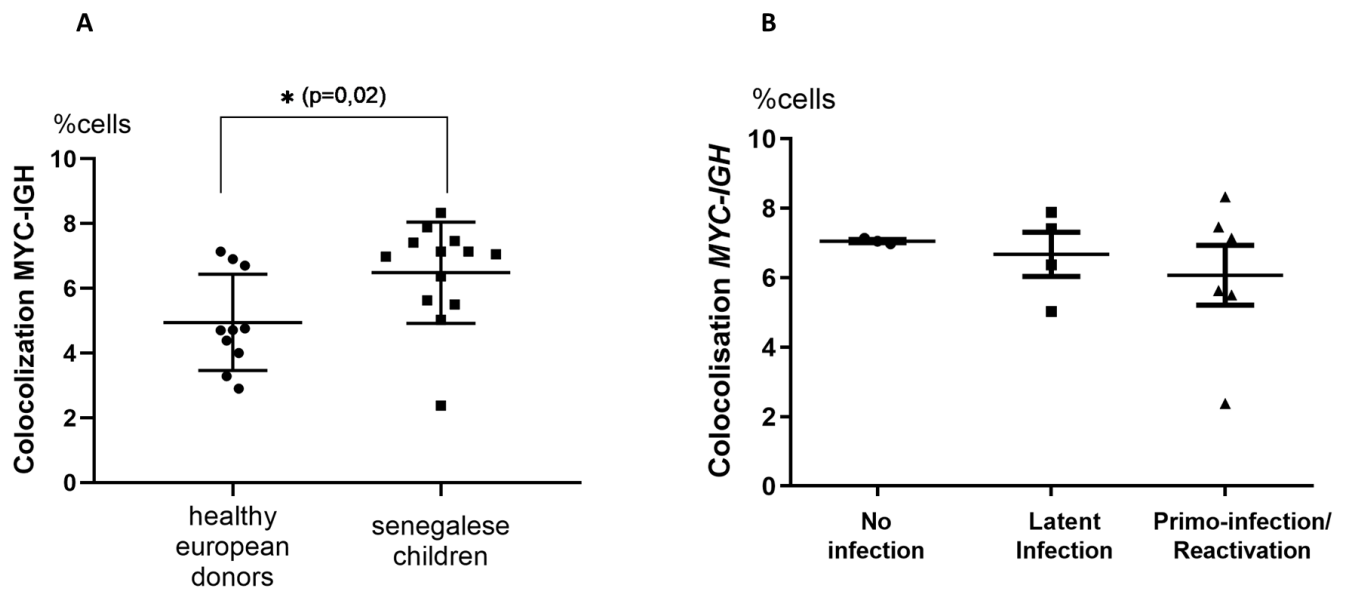


Figure 30: Colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B circulants des enfants vivant en zone d'endémie.

2.3. Optimisation d'une technique pour l'isolement des lymphocytes B circulant EBV positif des enfants

Nous avons ensuite pensé à identifier les cellules EBV positives en ajoutant à la FISH une troisième sonde ciblant le génome du virus EBV. Nous avons utilisé des cellules de la lignée Jurkat comme contrôle négatif et des LCLs comme contrôle positif. Cependant, nous n'avons pas pu identifier avec les échantillons des enfants aucune cellule B circulante EBV positive avec cette technique (une image représentative est montrée avec la Figure 31). Ces résultats ne sont cependant pas surprenants, considérant que le nombre de cellules B circulant infectées par EBV est extrêmement faible, dans l'ordre de $1-50/10^6$ cellules en phase de latence et $1-10/10^4$ cellules en phase de réactivation (Nijland et al., 2016). Ainsi, pour augmenter la probabilité de trouver une cellule EBV positive en technique de FISH sur lame il faut analyser un très grand nombre de cellules (plus d'1 million), ce qui n'était pas faisable techniquement. Nous avons alors réfléchi à une technique plus sensible permettant d'identifier et d'isoler les cellules B circulants EBV-positives chez ces enfants. La technique de FISH en suspension ou « Flow FISH » a été testée. Nous avons mélangé deux populations cellulaires LCLs RPMI8866 et Jurkat avec une majorité de cellules Jurkat. Les cellules ont été traitées pour une FISH en suspension avec une sonde ciblant le génome du virus EBV, puis triées avec le cytomètre pour isoler les cellules EBV positives. Cependant les résultats obtenus n'étaient pas satisfaisant. Une auto-

fluorescence des cellules était à l'origine d'un bruit de fond très fort, ne permettant ainsi pas au cytomètre de distinguer les cellules EBV-négatives de celles EBV-positives (toutes les cellules aussi bien LCLs que les Jurkat apparaissaient positives).

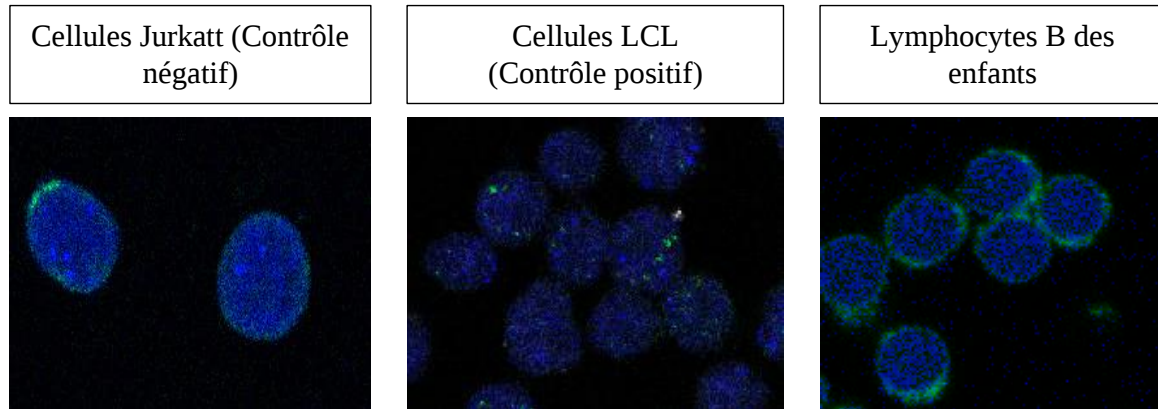


Figure 31: Images représentative d'un marquage du génome EBV dans les cellules
(Bleu = DAPI et Vert = Génome du virus EBV)

En conclusion, plus de 90% des enfants de notre population d'étude avaient une sérologie EBV positive. Le taux de colocalisation *MYC-IGH* chez ces enfants sénégalais était plus élevé comparé aux donneurs sains européens. Mais, ces résultats doivent être interprétés avec prudence après élimination des biais liés à l'âge et l'état de santé. Ces données peuvent cependant orienter vers l'étude de la position des loci *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B d'enfants vivant en zone d'endémie, comparée à une population occidentale appariée selon l'âge et éventuellement l'existence d'une pathologie sous jacente. Par ailleurs, nous n'avons pas pu obtenir de données concluantes sur une relation entre le statut de l'infection à EBV et le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B des enfants vivant en zones d'endémie EBV. L'optimisation d'une technique d'isolement des lymphocytes B infectés par EBV est nécessaire chez ces enfants afin de pouvoir étudier l'impact du virus EBV sur la position des loci *MYC* et *IGH* in vivo.

3. Article 4 : La protéine Tat du VIH-1 induit une expression aberrante de l'enzyme AICDA dans les lymphocytes B

Le deuxième volet de mon travail s'est intéressé au VIH, le deuxième virus associé au LB, définissant une entité individualisée : le LB associé au VIH. Avec l'avènement de la trithérapie antirétrovirale qui inhibe la réplication virale et restaure l'immunité des patients, l'incidence des LNH a beaucoup diminué chez les PVVIH à l'exception du LB pour lequel, la probabilité de survenue demeure 30 à 50 fois plus élevée comparée à la population générale. Ce constat suggère que l'oncogenèse du LB liée au VIH était au moins en partie indépendante du déficit immunitaire induit par le virus, d'où la nécessité de rechercher de nouveaux mécanismes d'oncogenèse liée au VIH dans le cadre du LB. Ceci est d'autant plus intéressant que le VIH n'infecte pas les cellules B.

Ainsi, au même titre que le virus EBV, depuis quelques années l'équipe du Dr Yegor Vassetzky s'est penchée sur le rôle joué par le VIH dans la formation de la translocation spécifique du LB. Les travaux publiés en 2017 ont permis de mettre en évidence une augmentation significative du taux de colocalisation *MYC-IGH in vitro*, dans les lymphocytes B normaux traités par la protéine Tat du VIH-1 et *in vivo*, dans les lymphocytes B circulants des PVVIH (Germini et al., 2017). Dans ce travail, nous montrons que la protéine Tat était en même temps responsable, *in vitro* dans les lymphocytes B, d'une expression aberrante du gène *AICDA* qui code pour l'enzyme AID; surexpression retrouvée également chez quelques PVVIH. AID introduit physiologiquement des cassures double brins d'ADN sur le gène *IGH* au cours des processus de maturation des lymphocytes B. La proximité de *MYC* avec *IGH* précédemment décrite favoriserait la probabilité de cassures doubles brins d'ADN accidentelles sur *MYC* par l'AID et secondairement la formation de la translocation entre les deux loci. Ainsi, par l'intermédiaire de sa protéine Tat, le VIH apparaît impliqué dans deux des trois conditions nécessaires à la formation de la t(8 ;14): la proximité *MYC-IGH* et les cassures doubles brins simultanées sur les deux loci.



HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B-lymphocytes from peripheral blood

Fatimata Bintou Sall^{1,2} | Rawan El Amine^{1,2} | Diana Markozashvili³ |
Tatyana Tsfasman^{1,2} | Eric Oksenhendler⁴ | Marc Lipinski^{1,2} | Yegor Vassetzky^{1,2,5} |
Diego Germini^{1,2}

¹Department of UMR8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

²LIA 1066 French–Russian Joint Cancer Research Laboratory, Villejuif, France

³Laboratory of Synthetic Biology, Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, Russia

⁴Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France

⁵Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia

Correspondence

Diego Germini, UMR8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif, 94805, France.
Email: germinidiego@gmail.com

Funding information

Ligue Contre le Cancer; Agence Nationale de Recherches sur le Sida et les Hépatites Virales; Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Grant/Award Number: Plan Cancer/Enviburkitt; La Ligue Contre le Cancer, Grant/Award Number: M27231

Abstract

Individuals infected with human immunodeficiency virus (HIV) are at increased risk for Burkitt lymphoma, a B-cell malignancy which occurs after a chromosomal translocation rearranging the *MYC* oncogene with an immunoglobulin gene locus, usually the *IGH* heavy chain gene locus. We have previously reported that the HIV protein Tat which circulates in all HIV-positive individuals whatever their immune status caused an increased rate of colocalization between *IGH* and *MYC* in B-cells nuclei. We here present in vitro evidence that Tat activates the expression of the *AICDA* gene that encodes the activation-induced cytidine deaminase whose physiological function is to create double-strand breaks for immunoglobulin gene maturation. In the presence of Tat, DNA damage was observed concomitantly in both *MYC* and *IGH*, followed by DNA repair by nonhomologous end joining. *AICDA* was further found overexpressed in vivo in peripheral blood B-cells from HIV-infected individuals. Thus, the capacity of Tat to spontaneously penetrate B-cells could be sufficient to favor the occurrence of *MYC-IGH* oncogenic rearrangements during erroneous repair, a plausible cause for the increased incidence of Burkitt lymphoma in the HIV-infected population.

KEYWORDS

activation-induced cytidine deaminase (AID), B-cell, human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) Tat, *IGH*, oncogenesis

1 | BACKGROUND

The human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) is a lentivirus that primarily infects CD4⁺T cells, dendritic cells and macrophages (Vérollet, Le Cabec, & Maridonneau-Parini, 2015). Despite the fact that it does not infect B-lymphocytes, B-cell dysfunctions (hyperactivation, apoptosis, inhibition or induction of immunoglobulin class switching), and B-cell lymphomas are commonly observed in HIV-infected individuals (Dolcetti, Gloghini, Caruso, & Carbone, 2016; Moir & Fauci, 2009; Sall et al., 2018; Shen & Tomaras, 2011). Now that combined antiretroviral therapy (cART) has significantly diminished the HIV-induced immunodeficiency that used to

expose patients to many cell transformation processes, most malignancies occur in HIV-infected individuals with the same frequency as in the overall population. However, this is clearly not the case for Hodgkin and some non-Hodgkin lymphomas which still occur at a higher rate in the HIV-infected population (Clifford et al., 2005; Engels et al., 2008; Gibson, Morton, Shiels, Clarke, & Engels, 2014; Shiels et al., 2018). This is particularly true for Burkitt lymphoma whose frequency has not significantly declined in cART-treated individuals as compared to the pre-cART era (Cobucci et al., 2015; Gibson et al., 2014; Grogg, Miller, & Dogan, 2007; Robbins, Shiels, Pfeiffer, & Engels, 2014). Burkitt lymphoma is a non-Hodgkin B-cell lymphoma characterized by specific chromosomal

translocations that all concern the *MYC* proto-oncogene. In 80% of the cases, *MYC* which lies on chromosome 8 is translocated to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene locus on chromosome 14 resulting in a pathognomonic t(8;14)(q24;q32) translocation (reviewed in (Grogg et al., 2007).

We have started to examine how HIV can play a role in the genesis of such B-cell lymphomas because their persistently high incidence does not seem to be attributable to a perturbed immune status. We have thus turned our attention to HIV-encoded proteins which can reach cells that are not HIV-infectable and asked whether they could play a role in oncogenic events. Tat is one such candidate. Tat transgenic mice have been reported to develop B-cell lymphomas (Kundu et al., 1999). A small (approximately 12 kDa) hydrophobic protein, Tat is secreted by HIV-infected cells, circulates in blood and thanks to its hydrophobic and charged cell-penetrating domain can penetrate any encountered cell (Musinova, Sheval, Dib, Germini, & Vassetzky, 2016). The role of Tat is fundamental for viral replication as it activates the transcription of other viral genes (Mbonye & Karn, 2014; Van Lint, Bouchat, & Marcello, 2013). Tat is also known to modulate cellular processes by interaction with different cellular structures. Dotted with nuclear and nucleolar localization signals (Kurnaeva, Sheval, Musinova, & Vassetzky, 2019), it accumulates in the nucleus (Romani, Engelbrecht, & Glashoff, 2010) where it directly interacts with chromatin thereby regulating the transcription of hundreds of host genes (Marban et al., 2011; Reeder, Kwak, McNamara, Forst, & D'Orso, 2015). Our previous work has demonstrated that *in vitro*, Tat induces oxidative stress and DNA damage in peripheral blood lymphocytes (El-Amine et al., 2018). Moreover, it perturbs the nuclear organization of normal circulating B-cells inducing a repositioning of the *MYC* locus in close proximity to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene locus (Germini et al., 2017). Importantly, similar observations have been made in peripheral blood lymphocytes from HIV-infected individuals undergoing cART (El-Amine et al., 2018; Germini et al., 2017). We have thus proposed that in HIV-infected patients, this newly acquired proximity exposes the two loci to a higher risk of concomitant breakage and erroneous rejoining during DNA repair that could end up in t(8;14) chromosomal translocations and Burkitt lymphomas.

The translocations observed in Burkitt lymphomas are mostly generated in the course of the somatic hypermutation and immunoglobulin class-switch recombination, events that are required to produce specific affine antibodies (Dorsett et al., 2007; Ramiro et al., 2004). These internal rearrangements in the immunoglobulin heavy chain gene locus are triggered by the activation-induced cytidine deaminase (AID), an enzyme encoded by the *AICDA* gene which converts cytosines to uracils in DNA. U:G mismatches thus created are then processed to create double-strand breaks (DSBs) which are subsequently repaired *via* the nonhomologous end joining (NHEJ) mechanism (Maul & Gearhart, 2010; Ramiro et al., 2004). Restricted to B-cells, the *AICDA* expression takes place in lymph nodes during cell activation.

AID has previously been associated with the generation of the t(8;14) translocations in B-cells (Dorsett et al., 2007; Ramiro et al., 2004; Robbani et al., 2008, 2009; Sall et al., 2018). In activated murine B-cells, it has been shown to target genomic regions other than *IGH*, including the *MYC* region (Chandra, Bortnick, & Murre, 2015; Ramiro et al., 2004; Robbani et al., 2008; Rocha et al., 2012). Earlier, we have demonstrated that ectopically expressed AID is sequestered in a perinucleolar compartment where it colocalizes with the *IGH* locus during human B-cell differentiation (Pichugin et al., 2017). Here, we have found that elevated *AICDA* expression levels could be observed in naive B-cells from HIV-positive individuals and that, *in vitro*, Tat-induced aberrant expression of the *AICDA* gene in normal peripheral blood B-cells. This transient activation coincided with increased DNA damage and repair within the *IGH* gene locus, suggesting that indirectly, HIV-1 Tat plays a major role in the induction of Burkitt-specific chromosomal translocations.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethical statement

In agreement with French law, the study was registered as a noninterventonal study at the Agence Nationale de Sécurité du Médicament (2016-A01316-45) and informed consent was obtained from all subjects.

2.2 | HIV patients and controls

Whole blood samples were obtained from 13 HIV-positive individuals under antiretroviral treatment followed in the Department of Clinical Immunology, Hôpital Saint-Louis, Paris, France. Two patients were reanalyzed after 3 months of treatment. Whole blood samples from healthy donors of different sex and age were obtained from the "Etablissement Français du Sang," Hôpital Saint-Louis, Paris, France.

2.3 | Cells

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Pancoll (PAN Biotech, Aidenbach, Germany, lymphocyte separation medium) density gradient centrifugation. B cells were purified by a negative selection process using the MagniSort B-cells enrichment kit II (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA). The B-cells were then kept at 37°C in RPMI 1640 enriched with 10% fetal bovine serum (Gibco®, Thermo Fisher Scientific) and 1% penicillin/streptomycin for the indicated time points with or without specific treatments. B-cells from HIV-infected individuals were purified in a Biosafety Level 3 laboratory as described above.

2.4 | B-cell incubation

B-cells cultivated at a concentration of 10⁶ cells/ml were treated with 250 ng/ml purified Tat for different time points. We used a recombinant Tat protein produced by ABL Inc (Rockville, MD) and obtained through the NIH AIDS Research and Reagent Program.

According to the manufacturer, the Tat protein was >95% pure after purification by heparin-affinity chromatography and reverse phase high performance liquid chromatography which removed endotoxins (Dudley, McKinstry, Thomas, Best, & Jenkins, 2003). B-cell were activated by incubation with a cocktail containing 10 ng/ml recombinant human interleukin 4 (IL4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1 µg/ml anti-human monoclonal antibodies to CD40 (Biolegend, San Diego, CA; clone G28.5), and 20 µg/ml monoclonal anti-human IgM (clone DA4.4, kindly provided by Dr. Joëlle Wiels).

2.5 | Quantitative reverse transcription PCR

Total RNA was extracted from B-cells using the NucleoSpin® RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland). RNA concentration was measured with NanoDrop. One hundred fifty nanograms of total RNA was then primed with oligo(dT) primer and reverse-transcribed in a 20 µl reaction mixture according to the manufacturer's instructions (Thermo Fisher Scientific). The obtained cDNA was amplified using specific primers and the PowerUp SYBR green master mix (Thermo Fisher Scientific). Expression of the target genes was analyzed using the ΔC_t method normalized by *GAPDH*. The *AICDA* expression was compared in the treated and untreated cells. The following primer sequences were used: *AICDA*, forward 5'-TCTTGATGAACCGGAGGAAG-3', reverse 5'-AGC CGTTCTTATTGCGAAGA-3'; *GAPDH* forward 5'-CTGCACCACCAACT GCTTAG-3', reverse 5'-AGGTCCACCACTGACACGTT-3'.

2.6 | B-cell activation fluorescence-activated cell sorting analysis

B-cells were activated as previously described. Activation was analyzed by flow cytometry with PE-labeled anti-CD23 B-cell activation marker, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-CD19 B-cell specific marker (Biolegend). A total of 500,000 cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and stained for 20 min at 4°C with the labeled antibodies. Cells were analyzed on LSR-II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA). Results were analyzed using the WinList software (Verity Software House, Topsham, ME).

2.7 | Chromatin immunoprecipitation-on-chip

Chromatin isolation was performed as previously described (Markozashvili et al., 2016). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) was performed as follows: 21 µg of chromatin solution was incubated overnight with 25 µl of the PrG-Dynabeads (Sigma-Aldrich) and 1–5 µg of antibodies in 1 ml reaction solution. A total of 5 µg panH3Ac (Merck Millipore, Darmstadt, Germany); 4 µg of panH3 (Merck Millipore); or 2 µg control IgG rabbit antibodies (Sigma-Aldrich) were used per reaction. Extracted DNA was reverse-crosslinked, washed with the appropriate buffers from the ChIP-IT Express kit (Active Motif, La Hulpe, Belgium) and purified by phenol–chloroform extraction. After amplification, DNA samples were hybridized to the two-colored SurePrint G3 Human Promoter

Microarray, 1 × 1 M (G4873A; Agilent, Palo Alto, CA) covering gene promoter zones of the human genome. Labeling, hybridization, and washing were carried out according to the Agilent mammalian ChIP-chip protocol (ver.9.0). ChIP-on-chip data analysis was performed as previously described (Allinne et al., 2014; Markozashvili et al., 2016).

2.8 | Immuno-3D FISH

"RainbowFISH" probes used for hybridization and staining of human chromosome loci 8q24 (*MYC* gene locus), 14q32 (*IGH* gene locus) were provided by Empire Genomics (Buffalo, NY). Cells were immunofluorescently stained with the following antibodies: rabbit anti-Histone H2AX phospho-Ser139 (Active Motif) and rabbit anti-MRE11 antibody (Santa Cruz Biotech, Inc., Santa Cruz, CA). Nuclei were stained with DAPI diluted into the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Immuno-3D-FISH was performed as previously described (Germini et al., 2017).

2.9 | Image acquisition and analysis

Immuno-3D-FISH images were acquired using a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Berlin, Germany) with a 63X oil immersion objective. Z-stacks were acquired using a frame size of 1024 × 1024, and 0.5 µm z-steps, with sequential multitrack scanning using the 405, 488, 543, 633 nm laser wavelengths. For analysis of *IGH/γH2AX*, *IGH/MRE11*, *IGH/MYC/MRE11*, or *MYC/γH2AX* colocalizations, the LEICA Application Suite X (Leica Microsystems) software was used.

2.10 | Statistics

Comparisons between more than two averages were performed using the Bonferroni's posttest based on the results generated using the one-way analysis of variance test. All tests were performed using the Graphpad Prism 5 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA).

3 | RESULTS

3.1 | HIV-1 Tat activates *AICDA* expression in B-cells

From previous studies, we knew that the expression of the *AICDA* gene had been found elevated in PBMCs from HIV-infected individuals who were found later to develop non-Hodgkin lymphomas (Epeldegui et al., 2007). We wanted to extend this analysis to B-cells purified from the blood of HIV-infected individuals undergoing cART. *AICDA* was found overexpressed in samples of peripheral blood B-cells from five HIV-infected individuals out of thirteen tested with a fold change ranging from 1.4 to 2.7. In the remaining eight individuals, the expression of *AICDA* was either similar as, or lower than, those in the controls (here set as 1; Figure 1a). Such variability was verified when two individuals were retested three months after the initial test (Figure S1). Similarly, we have previously reported that

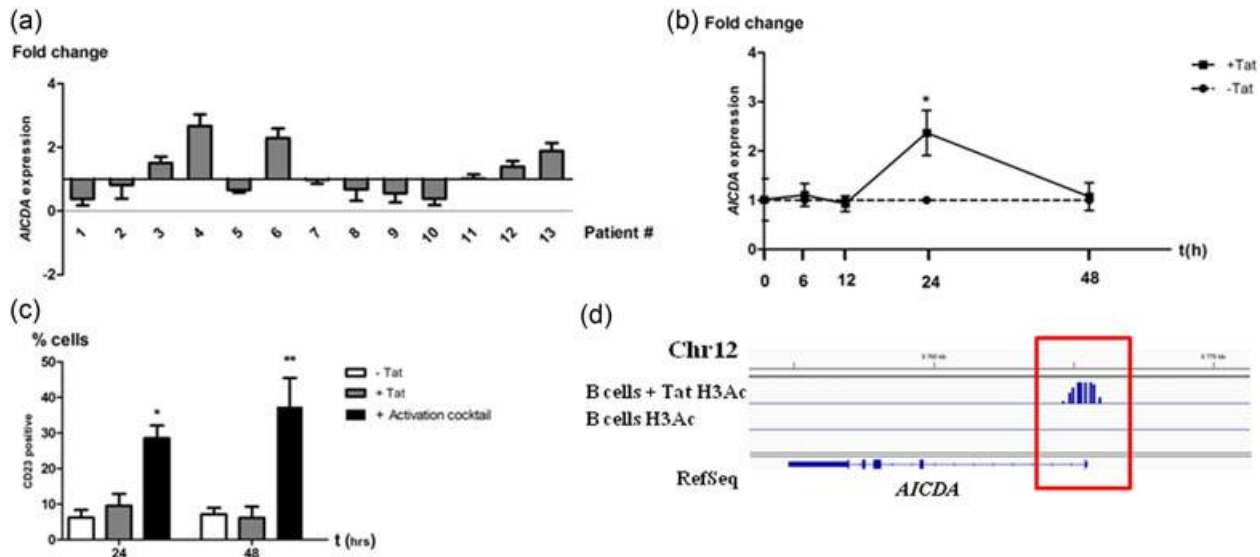


FIGURE 1 *AICDA* is overexpressed in B-cells from HIV-infected individuals and in B-cells from healthy donors treated with HIV-Tat. (a) *AICDA* gene expression in B-cells of HIV-infected individuals. *AICDA* mRNA levels were measured in B-cells isolated from HIV-positive individuals as described in Section 2 using RT-qPCR. RNA isolated from B-cells of three healthy donors was used as the control. The *AICDA* expression was normalized versus *GAPDH* and *AICDA* expression level in the healthy controls was set as 1. RT-qPCR was done in three technical replicates. (b) Kinetic analysis of *AICDA* expression in B-cells from healthy donor treated with Tat. Cells purified from healthy donors were incubated with 250 ng/ml purified Tat protein for the indicated times. The *AICDA* expression was normalized versus *GAPDH* and *AICDA* expression level in the untreated controls was set as 1. Data are means $\pm$ SEM; * p < 0.05. The experiment was performed on B-cells from three different healthy donors. (c) Tat does not activate B lymphocytes. Cells were treated for 24 and 48 hr with the recombinant Tat protein or with a cocktail of antibodies and cytokines (IL4, anti-human monoclonal antibodies to CD40 and monoclonal anti-human IgM) that stimulates B-cells activation or left untreated. Cell was then analyzed by FACS for the B-cell activation marker CD23. Histograms represent the percentage of cells expressing the CD23 in the different experimental conditions. The experiments were performed on B-cells from two different healthy donors. Data are means $\pm$ SEM; ** p < 0.01; * p < 0.05. (d) Tat-induced hyperacetylation of H3K9 in the *AICDA* gene promoter. Integrated Genome Viewer visualization of H3K9Ac peaks is shown in Tat-treated or untreated B-cells from one healthy donor. The acetylation profile of the *AICDA* locus is shown for the Tat-treated and untreated cells. The red square highlights the region of interest. FACS: fluorescence-activated cell sorting; HIV: human immunodeficiency virus; IL4: interleukin 4; mRNA: messenger RNA; RT-qPCR: quantitative reverse transcription PCR; SEM: standard error of the mean [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

blood concentrations of Tat vary in HIV-infected individuals both from one patient to another and at different time points in a given patient (Germini et al., 2017).

We next wanted to explore whether *AICDA* expression depended upon Tat. B-cells purified from the blood of healthy donors were treated with 250 ng/ml of recombinant Tat protein. Expression levels were compared at different time points to those in untreated B-cells. As seen in Figure 1b, the *AICDA* gene was found upregulated 2.4 ± 0.4 -fold at 24 hr in the presence of Tat (p < 0.05) and returned to the control levels at 48 hr. It thus appears possible that once penetrated by Tat, circulating B-cells will activate *AICDA* transcription. *AICDA* expression has been reported to be upregulated during B-cell activation (Xu et al., 2007). In our hands, Tat did not induce B-cells to express CD23 (Figure 1c; Figure S2), a B-cell activation marker (Patuzzo et al., 2013). Thus, the expression of *AICDA* induced in B-cells incubated in the presence of Tat occurs in an activation-independent manner.

Gene transcription is finely regulated by a variety of posttranslational histone modifications. Histone H3 acetylation is a landmark of active chromatin. We investigated the chromatin status of peripheral blood B-cells isolated from healthy donors and incubated in the presence of Tat for up to 48 hr. The distribution of pan-acetylated H3

(H3Ac) was analyzed using ChIP-on-chip. The presence of H3 acetylation was observed in the promoter region of *AICDA* in cells incubated with Tat but not in the absence of Tat (Figure 1d).

3.2 | B-cells treated with Tat exhibit high levels of DNA damage and repair within the IGH locus

Physiologically, in B-cells, the AID enzymatic activity produces DNA damage in the *IGH* gene locus, one of its major targets. Because of its low abundance, endogenous AID cannot be directly visualized by immunostaining. A conventional way to visualize AID activity is to observe the DNA damage induced by this enzyme. We thus used immuno-3D-FISH to investigate the results of possible AID activation at the level of the *IGH* locus in B-cells. γ H2AX foci, a marker of DNA damage, were indeed found colocalized with the *IGH* locus at a rate higher in Tat-treated than in untreated B-cells and this was particularly significant at 24 hr of Tat incubation ($8.1 \pm 0.3\%$ vs. $4.5 \pm 0.4\%$, respectively; p < 0.01; Figure 2a), coinciding with the peak of *AICDA* overexpression. A representative immuno-3D-FISH image is shown in Figure 2b. In contrast, γ H2AX/MYC colocalizations remained at a basal level (4–5% of the cells) whether in Tat-treated or untreated B-cells (data not shown).

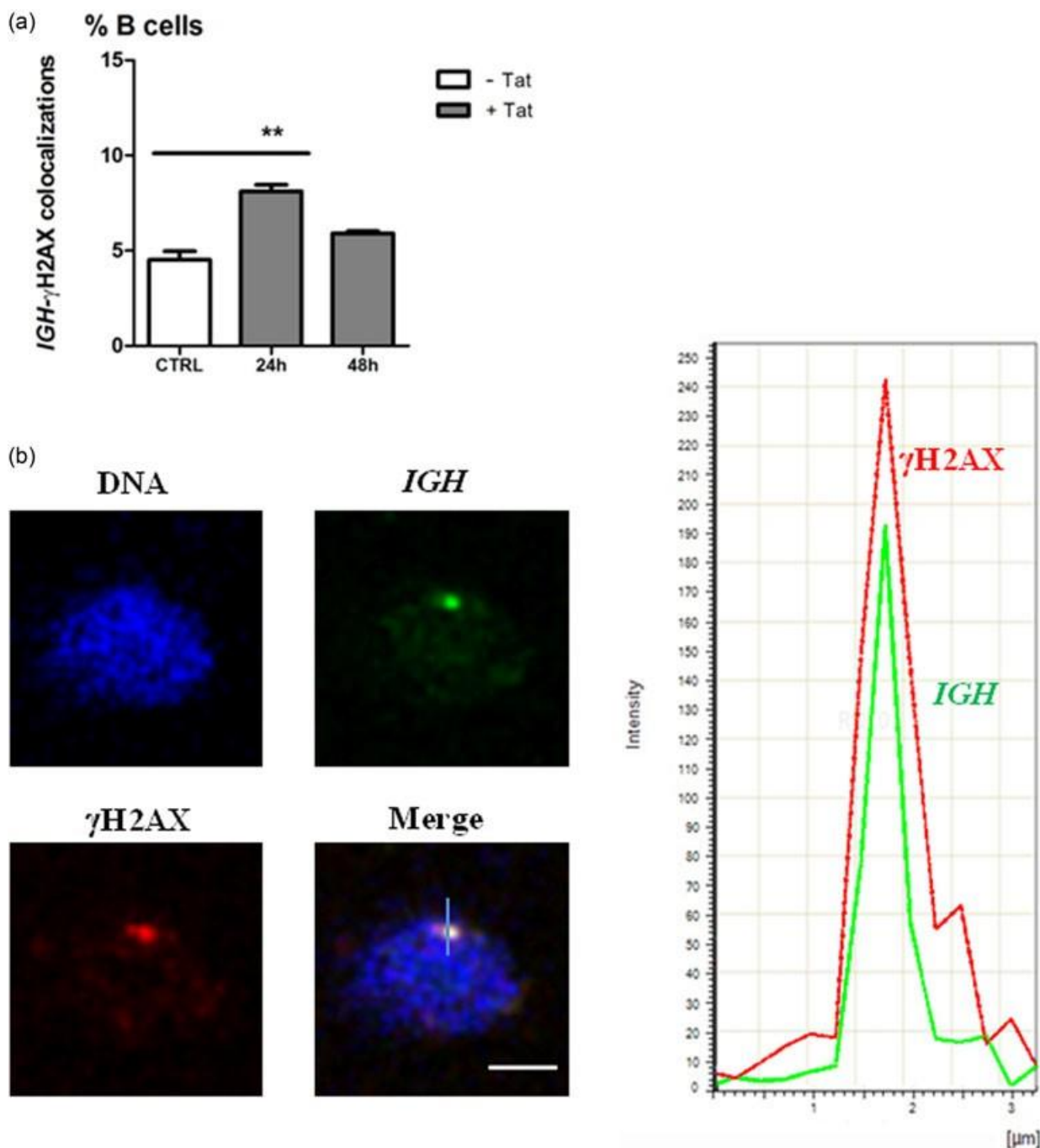


FIGURE 2 Tat induces DNA damage within the *IGH* locus concomitantly with *AICDA* overexpression. (a) Tat-induced γ H2AX colocalization with the *IGH* locus. Percentages of B-cell nuclei purified from healthy donors showing γ H2AX foci colocalized with *IGH* loci after different times of incubation in the presence or absence of the purified recombinant Tat protein. Data for γ H2AX-*IGH* are represented as means $\pm$ SEM and were calculated from a minimum of 460 *IGH* loci examined in samples from two different donors, $^{**}p < 0.01$. (b) A representative image of a B-cell showing γ H2AX/*IGH* colocalization. B-cells were fixed, processed and stained by immuno-3D FISH for DNA (blue), *IGH* (green), and γ H2AX (red) after 24 hr of incubation in the presence of 250 ng/ml purified Tat (left panels). Scale bar = 3 μ m. The right panel illustrates *IGH* and γ H2AX colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the Merge picture on the left, with respective peak intensities (y-axis). SEM: standard error of the mean [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Because AID induces DNA damage, we reasoned that incubating B-cells with Tat should induce higher amounts of DNA breaks. AID-induced DNA damage is known to be repaired through the NHEJ pathway whose initial steps involve the mobilization of the MRN

complex (Xie, Kwok, & Scully, 2009). We thus looked for MRE11, a component of this complex, at the level of the *IGH* gene locus. During the 48 hr of Tat incubation, B-cells indeed exhibited increasing amounts of MRE11 foci and this was significantly more important in

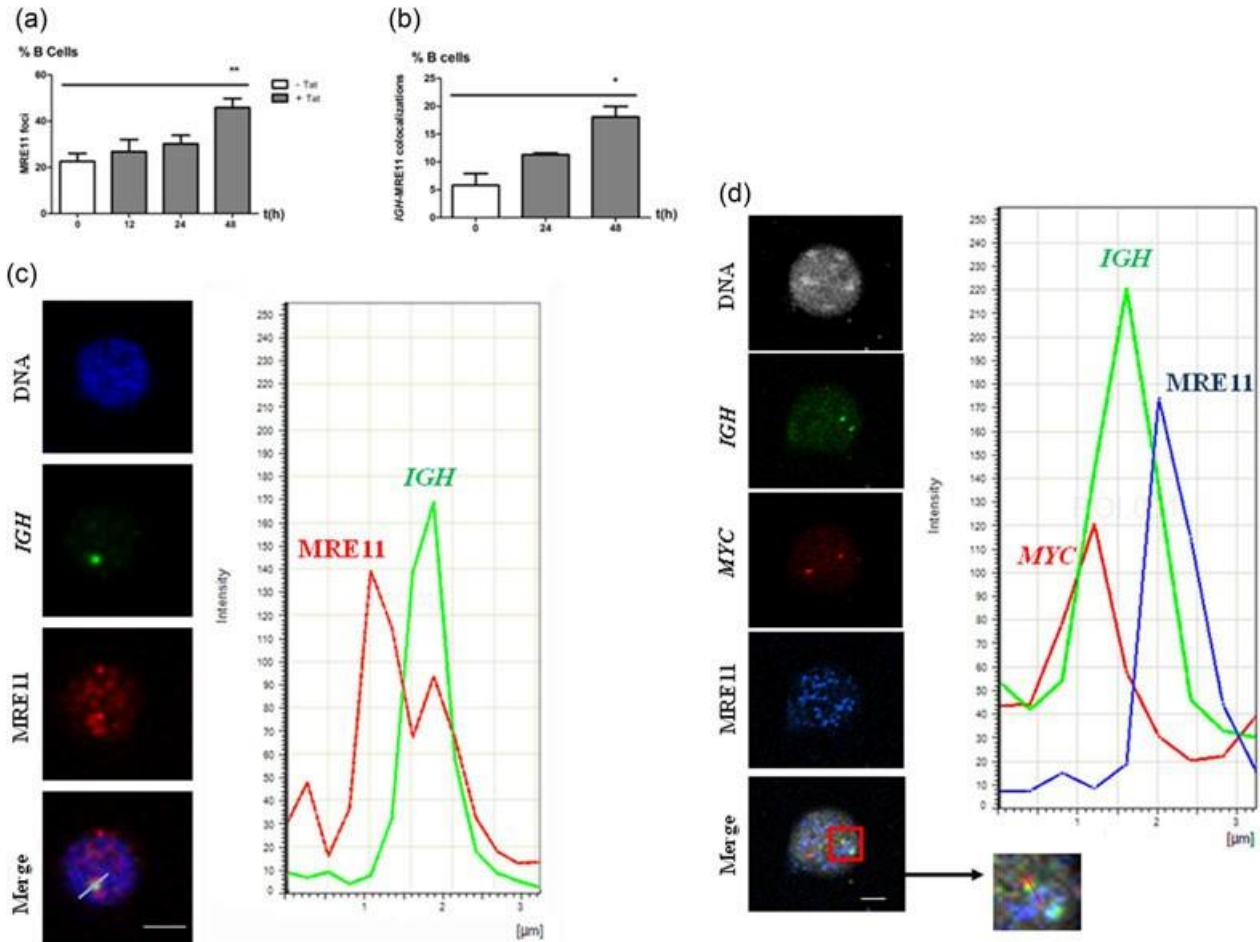


FIGURE 3 DNA repair machinery proteins are present within the *IGH* locus after the induction of DNA damage. (a) Analysis of MRE11 immunofluorescence in nuclei from normal B-cells incubated in the presence or absence of the purified Tat protein for different time points. The average percentages of cells showing MRE11 foci were calculated from a minimum of 100 cells examined. Kinetic data are means $\pm$ SEM from at least three fields with stained B-cells from two different donors, $**p < 0.01$. (b) Tat-induced MRE11 colocalization with the *IGH* locus. Percentage of B-cell nuclei purified from healthy donors showing MRE11 foci colocalized with *IGH* loci after different times of incubation in the presence or absence of the purified Tat protein. Data (means $\pm$ SEM) for MRE11/*IGH* colocalizations were calculated from a minimum of 200 *IGH* loci examined in samples from two different donors, $*p < 0.05$. (c) A representative image of a B-cell showing MRE11/*IGH* colocalization. B-cells were fixed, processed and stained by immuno-3D FISH for DNA (blue), *IGH* (green) and MRE11 (red) after 48 hr of incubation in the presence of purified Tat (left panels). Scale bar = 3 μ m. The right panel illustrates *IGH* and MRE11 colocalization (x-axis) along the white bar drawn in the Merge picture on the left, with respective peak intensities (y-axis). (d) A representative image of a B-cell showing MRE11, *IGH*, and *MYC* located in close proximity. B-cells were fixed, processed and stained by immuno-3D FISH for DNA (grey), *IGH* (green), *MYC* (red), and MRE11 foci (blue). Scale bar = 3 μ m. The histogram illustrates *IGH*/*MYC*/MRE11 proximity (x-axis) along the red bar drawn on the detail of the merged picture highlighted by the red square, with respective peak intensities (y-axis). SEM: standard error of the mean [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

Tat-treated than in untreated B-cells ($45.8 \pm 4\%$ vs. $22.6 \pm 3.4\%$; Figure 3a; Figure S3). As expected, the presence of MRE11 at the *IGH* locus increased during Tat incubation with kinetics consistent with that observed for DNA breaks. At 48 hr of Tat incubation, the number of cells with MRE11 foci in close proximity with the *IGH* gene locus increased to $18.1 \pm 1.9\%$ in Tat-treated cells versus $5.8 \pm 2.1\%$ in untreated control cells ($p < 0.05$; Figure 3b). One such colocalization is shown in Figure 3c. In cells incubated with Tat for 48 hr, proximity of the MRE11 protein with both *MYC* and *IGH* was occasionally observed (Figure 3d). Although rare and thus not statistically significant, such an observation is noteworthy as it illustrates the potential simultaneity of *MYC* and *IGH* both under-

going DNA breaks and therefore susceptible to chromosomal translocations due to erroneous DNA repair.

4 | DISCUSSION

When compared with the general population, HIV-infected individuals continue to be exposed to a higher risk of Burkitt lymphoma, even with immune functions restored and CD4+cell counts normalized under cART (Cobucci et al., 2015; Gibson et al., 2014; Grogg et al., 2007; Robbins et al., 2014). Previously, we have started to tackle this apparently paradoxical situation. When incubated in vitro

in the presence of a recombinant form of the HIV transactivating protein Tat, normal B-cells displayed changes in their nuclear organization resulting in a significantly enhanced rate of colocalization between the *MYC* and *IGH* gene loci in a central part of the nucleus (El-Amine et al., 2018; Germini et al., 2017). Strikingly, B-cells isolated from the peripheral blood of HIV-infected individuals were also found to exhibit such a colocalization more frequently than B-cells from control individuals (Germini et al., 2017). Being brought close to one another is not sufficient; however, for two loci located on different chromosomes to be at risk of erroneous recombination. For a reciprocal chromosomal translocation to occur, the two chromosomes must be broken on both strands concomitantly which triggers DNA repair through the NHEJ pathway with a known risk for erroneous recombination between the two chromosomes (Iarovaia et al., 2014). In this report, we have presented evidence that both *MYC* and *IGH* can be simultaneously targeted by AID, the enzyme responsible for the physiological breakages that are necessary during the process of Ig gene maturation in B lymphocytes.

From our present observations, the risky course could develop as follows. The Tat protein which circulates in detectable amounts in the blood of all patients harboring HIV continuously interacts with a variety of cells which it can penetrate due to its structural properties. Once inside B-cells, Tat activates, directly or indirectly, the *AICDA* gene which codes for AID. Indeed, *AICDA* was found overexpressed in Tat-incubated B-cells with a window of activation at approximately 24 hr of incubation in vitro. In vivo, *AICDA* was also found overexpressed in a proportion of HIV-positive individuals. Once translated, AID is brought to its major target in B-cells, the *IGH* gene locus which colocalizes with *MYC* more often in HIV-positive than in HIV-negative individuals. As seen through the appearance of γ H2AX signals in our immuno-3D-FISH experiments, DNA breaks are then produced simultaneously in both *IGH* and *MYC*. Next, the NHEJ repair process is initiated on both chromosomes as detected through the presence of MRE11, one of the components in the MRN repair complex. Consistent with this postulated chain of events, the peak of the presence of MRE11 at both *IGH* and *MYC* occurs at around 48 hr of Tat incubation, clearly after the peak of detection of DNA breaks. Thus, in otherwise normal B-cells, Tat appears to be responsible directly or indirectly for both an increased colocalization between *IGH* and *MYC* genes and activation of AID which can create DSBs in both *IGH*, its physiological target, and *MYC*, an unfortunate collateral DNA damage. In our view, this is sufficient to account for the persistently increased risk of occurrence of a t(8;14) translocation in B-cells thereby leading to the development of Burkitt lymphomas in this population of HIV-infected individuals.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by grants from the ANRS, INSERM (ENVIBURKITT), and La Ligue Contre le Cancer (M27231). TT was a recipient of the ANRS postdoctoral fellowship. Tat recombinant protein was obtained through the NIH AIDS Research and Reference Reagent program, USA. We gratefully acknowledge the imaging and cytometry platform of the Gustave Roussy Institute for the technical support.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare that they have no conflict of interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Y. V. and D. G. designed the study; F. B. S., R. E. L., D. M., T. T., and D. G. carried out the experiments; F. B. S., M. L., Y. V., and D. G. analyzed the data; E. O. contributed materials; F. B. S., M. L., Y. V., and D. G. wrote the manuscript.

ORCID

Yegor Vassetzky  <http://orcid.org/0000-0003-3101-7043>

Diego Germini  <http://orcid.org/0000-0002-6157-1929>

REFERENCES

- Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klihi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., ... Vassetzky, Y. S. (2014). Perinucleolar relocation and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood*, 123(13), 2044–2053. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-06-510511>
- Chandra, V., Bortnick, A., & Murre, C. (2015). AID targeting: Old mysteries and new challenges. *Trends in Immunology*, 36, 527–535. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.07.003>
- Clifford, G. M., Polesel, J., Rickenbach, M., Dal maso, L., Keiser, O., Kofler, A., ... Franceschi, S. (2005). Cancer risk in the Swiss HIV cohort study: Associations with immunodeficiency, smoking, and highly active antiretroviral therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, 97, 425–432. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji072>
- Cobucci, R. N. O., Lima, P. H., de Souza, P. C., Costa, V. V., Cornetta, M., Cornetta, Mda, & Gonçalves, A. K. (2015). Assessing the impact of HAART on the incidence of defining and non-defining AIDS cancers among patients with HIV/AIDS: A systematic review. *Journal of Infection and Public Health*, 8(1) <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2014.08.003>
- Dolcetti, R., Gloghini, A., Caruso, A., & Carbone, A. (2016). A lymphoma-genic role for HIV beyond immune suppression? *Blood*, 127(11), 1403–1409. <https://doi.org/10.1182/blood-2015-11-681411>
- Dorsett, Y., Robbiani, D. F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich, T. R., & Nussenzweig, M. C. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(9), 2225–2232. <https://doi.org/10.1084/jem.20070884>
- Dudley, A., McKinstry, W., Thomas, D., Best, J., & Jenkins, A. (2003). Removal of endotoxin by reverse phase HPLC abolishes anti-endothelial cell activity of bacterially expressed plasminogen kringle 5. *Biotechniques*, 35(4), 724–726. 728, 730 passim. <https://doi.org/10.2144/03354st02>
- El-Amine, R., Germini, D., Zakharova, V. V., Tsfasman, T., Sheval, E. V., Louzada, R. A. N., ... Vassetzky, Y. S. (2018). HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biology*, 15, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.11.024>
- Engels, E. A., Biggar, R. J., Hall, H. I., Cross, H., Crutchfield, A., Finch, J. L., ... Goedert, J. J. (2008). Cancer risk in people infected with human immunodeficiency virus in the United States. *International Journal of Cancer*, 123, 187–194. <https://doi.org/10.1002/ijc.23487>
- Epeldegui, M., Breen, E. C., Hung, Y. P., Boscardin, W. J., Detels, R., & Martínez-Maza, O. (2007). Elevated expression of activation induced cytidine deaminase in peripheral blood mononuclear cells precedes

- AIDS-NHL diagnosis. *AIDS*, 21(17), 2265–2270. <https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e3282ef9f59>
- Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O. V., ... Vassetzky, Y. S. (2017). HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia*, 31(11), 2515–2522. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.106>
- Gibson, T. M., Morton, L. M., Shiels, M. S., Clarke, C. A., & Engels, E. A. (2014). Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: A population-based study. *AIDS*, 28(15), 2313–2318. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000428>
- Grogg, K. L., Miller, R. F., & Dogan, A. (2007). HIV infection and lymphoma. *Journal of Clinical Pathology*, 60(12), 1365–1372. <https://doi.org/10.1136/jcp.2007.051953>
- Iarovaia, O. V., Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S. V., & Vassetzky, Y. S. (2014). Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Molecular Cancer*, 13, 249. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-13-249>
- Kundu, R. K., Sangiorgi, F., Wu, L. Y., Pattengale, P. K., Hinton, D. R., Gill, P. S., & Maxson, R. (1999). Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood*, 94(1), 275–282.
- Kurnaeva, M. A., Sheval, E. V., Musinova, Y. R., & Vassetzky, Y. S. (2019). Tat basic domain: A “Swiss army knife” of HIV-1 Tat? *Reviews in Medical Virology*, e2031. <https://doi.org/10.1002/rmv.2031>
- Marban, C., Su, T., Ferrari, R., Li, B., Vatakis, D., Pellegrini, M., ... Kurdistani, S. K. (2011). Genome-wide binding map of the HIV-1 Tat protein to the human genome. *PLoS One*, 6(11), e26894. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026894>
- Markozashvili, D., Pichugin, A., Barat, A., Camara-Clayette, V., Vasilyeva, N. V., Lelièvre, H., ... Vassetzky, Y. (2016). Histone deacetylase inhibitor abexinostat affects chromatin organization and gene transcription in normal B cells and in mantle cell lymphoma. *Gene*, 580, 134–143. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.01.017>
- Maul, R. W., & Gearhart, P. J. (2010). AID and somatic hypermutation. *Advances in Immunology*, 105, 159–191. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(10\)05006-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(10)05006-6)
- Mbonye, U., & Karn, J. (2014). Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure. *Virology*, 454–455, 328–339. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.008>
- Moir, S., & Fauci, A. S. (2009). B cells in HIV infection and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9(4), 235–245. <https://doi.org/10.1038/nri2524>
- Musinova, Y. R., Sheval, E. V., Dib, C., Germini, D., & Vassetzky, Y. S. (2016). Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 73, 589–601. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2077-x>
- Patuzzo, G., Mazzi, F., Vella, A., Ortolani, R., Barbieri, A., Tinazzi, E., ... Lunardi, C. (2013). Immunophenotypic analysis of B lymphocytes in patients with common variable immunodeficiency: Identification of CD23 as a useful marker in the definition of the disease. *ISRN Immunology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/512527>
- Pichugin, A., Iarovaia, O. V., Gavrilov, A., Sklyar, I., Barinova, N., Barinov, A., ... Vassetzky, Y. S. (2017). The IGH locus relocates to a “recombination compartment” in the perinucleolar region of differentiating B-lymphocytes. *Oncotarget*, 8(25), 40079–40089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16941>
- Ramiro, A. R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., ... Nussenzweig, M. C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell*, 118(4), 431–438. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.08.006>
- Reeder, J. E., Kwak, Y.-T., McNamara, R. P., Forst, C. V., & D'orso, I. (2015). HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells. *eLife*, 4, e08955. <https://doi.org/10.7554/eLife.08955>
- Robbiani, D. F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., ... Nussenzweig, M. C. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell*, 135(6), 1028–1038. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.062>
- Robbiani, D. F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., ... Nussenzweig, M. C. (2009). AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations. *Molecular Cell*, 36(4), 631–641. [https://doi.org/S1097-2765\(09\)00820-X](https://doi.org/S1097-2765(09)00820-X) [pii]10.1016/j.molcel.2009.11.007
- Robbins, H. A., Shiels, M. S., Pfeiffer, R. M., & Engels, E. A. (2014). Epidemiologic contributions to recent cancer trends among HIV-infected people in the United States. *AIDS*, 28(6), 881–890. <https://doi.org/10.1097/QAD.0000000000000163>
- Rocha, P. P., Micsinai, M., Kim, J. R., Hewitt, S. L., Souza, P. P., Trimarchi, T., ... Skok, J. A. (2012). Close proximity to Igh is a contributing factor to AID-mediated translocations. *Molecular Cell*, 47, 873–885. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.06.036>
- Romani, B., Engelbrecht, S., & Glashoff, R. H. (2010). Functions of Tat: The versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *The Journal of General Virology*, 91(Pt 1), 1–12. <https://doi.org/10.1099/vir.0.016303-0>
- Sall, F. B., Germini, D., Kovina, A. P., Ribrag, V., Wiels, J., Toure, A. O., ... Vassetzky, Y. (2018). Effect of environmental factors on nuclear organization and transformation of human B lymphocytes. *Biochemistry (Moscow)*, 83(4), 402–410. <https://doi.org/10.1134/S0006297918040119>
- Shen, X., & Tomaras, G. D. (2011). Alterations of the B-cell response by HIV-1 replication. *Current HIV/AIDS Reports*, 8, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s11904-010-0064-2>
- Shiels, M. S., Islam, J. Y., Rosenberg, P. S., Hall, H. I., Jacobson, E., & Engels, E. A. (2018). Projected cancer incidence rates and burden of incident cancer cases in HIV-infected adults in the United States through 2030. *Annals of Internal Medicine*, 168, 866–873. <https://doi.org/10.7326/M17-2499>
- Van Lint, C., Bouchat, S., & Marcello, A. (2013). HIV-1 transcription and latency: An update. *Retrovirology*, 10, 67. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-10-67>
- Vérollet, C., Le Cabec, V., & Maridonneau-Parini, I. (2015). HIV-1 infection of T lymphocytes and macrophages affects their migration via Nef. *Frontiers in Immunology*, 6(OCT), 514. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00514>
- Xie, A., Kwok, A., & Scully, R. (2009). Role of mammalian Mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(8), 814–818. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1640>
- Xu, Z., Pone, E. J., Al-Qahtani, A., Park, S.-R., Zan, H., & Casali, P. (2007). Regulation of aicda expression and AID activity: Relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Critical Reviews in Immunology*, 27(4), 367–397. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2006.10.010>

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Sall FB, El Amine R, Markozashvili D, et al. HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B-lymphocytes from peripheral blood. *J Cell Physiol*. 2019;1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.28219>

Discussion

Près de 50 ans après la découverte de la translocation t(8;14) du LB, les mécanismes de formation de cette anomalie chromosomique ne sont pas encore entièrement cernés. En particulier, le rôle joué par les deux principaux facteurs étiologiques EBV et VIH dans l'apparition de cette translocation n'a pas été beaucoup étudié. Probablement, l'existence de formes sporadiques, non associées à ces deux virus mais avec t(8;14) ne militait pas en faveur d'un rôle direct de ces virus dans le processus de formation de la t(8;14). Dans ce travail, nous fournissons des preuves d'une implication d'EBV et du VIH dans l'apparition de la t(8;14). Nous discuterons ces résultats et essayerons de proposer des modèles pour le développement des différentes formes de LB en tenant compte de nos résultats et des données déjà publiées.

1. *In vitro*, le cycle lytique du virus EBV favorise la proximité spatiale de *MYC* et *IGH* et augmente la probabilité de survenue de la translocation *MYC-IGH*

La proximité entre deux loci est une condition indispensable pour la formation de leur translocation. Dans les cellules B naïfs, *MYC* et *IGH* sont normalement situés dans des compartiments nucléaires différents, séparés par au moins 40% de l'espace nucléaire (Sklyar et al., 2016). Nous nous sommes alors demandé quel serait l'impact de la présence du virus EBV dans les cellules sur la position de *MYC* et *IGH*. Nous avons étudié, après une 3D-FISH dans différentes conditions de lignées cellulaires B, la proportion de cellules qui présentaient au moins un couple *MYC* et *IGH* distants d'au plus 1µm (qui correspond au taux de colocalisation *MYC-IGH*). Nos résultats ont montré que la réactivation du virus EBV dans les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs) RPMI8866 et PRIESS augmentait significativement le taux de colocalisation *MYC-IGH*, comparées aux cellules B circulantes EBV négatives issues de donneurs sains ou aux cellules infectées de façon latente. La réactivation des LCLs étant généralement difficile et inconstante, nous avons confirmé ces résultats dans des LCLs caractérisés par une activité lytique spontanée. Une augmentation similaire du taux de colocalisation *MYC-IGH* avait également été objectivée par notre équipe dans des cellules B périphériques de donneurs sains traitées avec une protéine Tat du VIH-1 purifiée (Germini et al., 2017). Plus intéressant encore, dans ce travail, nous avons pu montrer pour la première fois, grâce à l'utilisation d'un modèle cellulaire expérimental basé sur la technologie CRISPR/Cas9 que cette proximité induite par le cycle lytique doublait voire triplait la probabilité de survenue de translocation en cas de cassures doubles brins simultanées. Ces données sont en harmonie avec l'importance de la

proximité entre deux loci dans les mécanismes de formation des translocations. Cette proximité explique d'une part pourquoi deux loci sont plus fréquemment partenaires de translocation ; et d'autre part, pourquoi une translocation donnée survient plus spécifiquement dans un type cellulaire que dans un autre, le positionnement des loci étant tissu et cellule spécifique (Parada et al., 2004). Nos résultats renforcent aussi fortement les données existantes sur le rôle important joué par le cycle lytique, en particulier le cycle abortif dans les pathologies associées au virus EBV (Germini et al., 2020; Habib et al., 2017). En effet, seul un cycle lytique abortif permettrait à une cellule ayant acquis la t(8 ;14) au cours de la réactivation virale, de survivre et d'évoluer secondairement vers un clone tumoral. *In vivo*, les facteurs déterminants l'orientation vers un cycle lytique productif versus abortif ne sont pas très connus mais il est admis que seule une faible minorité de cellules B EBV positives effectuent un cycle lytique complet après stimulation (Al Tabaa et al., 2009). En outre, l'association du Lymphome de Burkitt endémique, avec le *Plasmodium falciparum* (Mawson and Majumdar, 2017b), *Euphorbia tirucalli* (Mannucci et al., 2012b) et potentiellement l'Aflatoxine B1 (Accardi et al., 2015), tous capable de réactiver le virus EBV *in vivo* et *in vitro* (Accardi et al., 2015; Chêne et al., 2007; MacNeil et al., 2003), suggère également une forte implication du cycle lytique du virus dans la pathogenèse de ce lymphome.

2. Par quel(s) mécanisme(s) la réactivation du virus EBV induit la proximité de *MYC* et *IGH* ?

L'induction de la proximité entre deux loci implique très probablement le mouvement d'un des loci vers l'autre locus, ou un mouvement simultané des deux l'un vers l'autre. Plusieurs situations peuvent provoquer le mouvement d'un locus. Sklyar et ses collaborateurs ont déjà rapporté une relocalisation de *MYC* vers l'usine de transcription occupé par *IGH* dans les cellules B activées (Sklyar et al., 2016). Il est également admis que l'épisome du virus EBV s'associe à des compartiments chromatinien inactifs durant la latence alors qu'il est présent au sein de compartiments transcriptionnellement actif durant la réactivation (Moquin et al., 2018). La réactivation pourrait ainsi induire une restructuration de l'architecture nucléaire, favorisant la relocalisation de loci, mais cela n'explique pas pourquoi spécifiquement *MYC* vers *IGH* et non pas par exemple *CCND1* et *IGH*.

Sachant que le cycle lytique du virus EBV déclenche une réponse aux dommages d'ADN (DDR) (Hau and Tsao, 2017; Wang'Ondu et al., 2015), dans ce travail nous nous sommes surtout concentrés sur les mécanismes de dommage et de réparation de l'ADN comme sources de mouvements chromatinien. En effet, les CDBs peuvent être à l'origine de mouvements chromatinien (Iarovaia et al., 2014; Krawczyk et al., 2012; Kruhlak et al., 2006), soit pour la recherche de partenaire de recombinaison (Miné-Hattab and Chiolo, 2020; Miné-Hattab and Rothstein, 2012) soit pour rejoindre les « centres de réparation » où sont concentrés les facteurs de réparation de l'ADN (Aten et al., 2004; Neumaier et al., 2012). Nous avons ainsi d'abord utilisé différents modèles cellulaires expérimentaux toujours basés sur la technologie CRISPR/Cas9 pour étudier l'effet de CDBs sur *MYC* et *IGH*, isolées ou en association, sur le taux de colocalisation *MYC-IGH*. Nos résultats montrent que l'augmentation du taux de colocalisation *MYC-IGH* était surtout corrélée à la présence de dommages sur *MYC* et non sur *IGH*, la présence de CDBs uniquement sur *IGH* n'étant pas associée à une augmentation du taux de colocalisation entre les deux loci. Le même mécanisme de mouvement de *MYC* vers *IGH* en réponse à des CDBs induites par les recombinaisons RAG a été rapporté dans les lymphocytes périphériques circulants en présence de la protéine Tat du VIH-1 (Germini et al., 2017). Spehalski et ses collaborateurs ont développé des lignées cellulaires B murines caractérisées par la présence d'un transgène contenant un exon VDJ réarrangé et toute la séquence de la région constante du locus *IGH* et la région 3' régulatrice dans les chromosomes 4, 7 ou 17 en plus du locus *IGH* endogène sur le chromosome 14. Dans ces lignées, en présence d'une expression aberrante de l'enzyme AID, *MYC* était capable de former une translocation avec *IGH* indépendamment du chromosome dans lequel le locus était présent (Spehalski et al., 2012). Dans cette étude les auteurs n'ont pas précisé si c'est *MYC* qui se déplaçait vers *IGH* ou l'inverse mais ces données renforcent la thèse d'une interaction préférentielle et spécifique entre les deux loci.

Après avoir établi le rôle de CDBs sur *MYC* dans l'induction de la colocalisation *MYC-IGH*, nous avons investigué la présence de CDBs sur *MYC* au cours de la réactivation du virus EBV dans les LCLs en utilisant la forme phosphorylée de l'histone H2AX comme marqueur de CDBs. Nos résultats ont ainsi retrouvé dans les LCLs une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant des CDBs sur *MYC* au cours du cycle lytique, qu'il soit induit ou spontané. Ces CDBs sur *MYC* pourraient expliquer une mobilité accrue du locus *MYC*, probablement pour

être réparé. Dans ces cellules, des dommages d'ADN pouvaient également être présents sur *IGH*, et dans ce sens, nous avons émis l'hypothèse selon laquelle *MYC* pourrait colocaliser avec *IGH* dans le même centre de réparation. Une triple colocalisation de *MYC*, *IGH* et 53BP1 – une protéine présente dans les centres de réparation – a été objectivée dans quelques cellules sans significativité majeure. Ainsi, deux questions restent non résolues. D'abord, pourquoi la réactivation du virus EBV induit des CDBs sur *MYC*? Cela pourrait être en rapport avec le rôle important que la protéine MYC semble jouer dans le switch de la latence vers le cycle lytique, la réactivation étant associée à une diminution de l'expression de MYC (Ersing et al., 2017; Guo et al., 2020). En effet, lorsque MYC est présent en grande quantité, elle se lie à l'origine de réplication lytique du génome EBV, empêchant son interaction avec le promoteur du gène *BZLF1* et donc la réactivation du virus (Guo et al., 2020). La deuxième équation est représentée par le mécanisme moléculaire qui détermine le mouvement de *MYC* vers *IGH*. Dans notre cas, la protéine Zebra d'EBV, homologue fonctionnelle de Tat, n'était pas suffisante pour induire la colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B non infectés. En effet le taux de colocalisation *MYC-IGH* ne variait pas après traitement de cellules B périphériques de donneurs sains traités avec une protéine recombinante Zebra. Nous avons ensuite étudié l'implication des protéines de différentes voies de réparation RAD51 (recombinaison homologue), MRE11 (recombinaison homologue et non homologue) et DNA-PK (recombinaison non-homologue classique), dans la colocalisation *MYC-IGH* induite par la réactivation du virus EBV. Seule l'inhibition de MRE11 par Mirin était associée à une diminution significative du taux de colocalisation *MYC-IGH*. En plus, la réactivation du virus EBV était associée à une surexpression du gène *MRE11*. Ces résultats suggèrent un rôle de la protéine MRE11 dans la mobilité du locus *MYC* et corroborent les données d'autres études impliquant MRE11 dans la relocalisation de CDBs (Aten et al., 2004; Caridi et al., 2018; Germini et al., 2017; Roukos et al., 2013). D'autres auteurs suggèrent plutôt que l'augmentation de la mobilité des CDBs facilite la recherche d'un donneur homologue et dépendrait plus des étapes précoces de la recombinaison homologue (Miné-Hattab and Rothstein, 2012). Nous pensons que cet effet de MRE11 sur la mobilité des CDBs est indépendante de son activité spécifique au cours des différentes voies de réparation et surviendrait au stade très précoce de la DDR avant même que le choix de la voie de réparation ne s'effectue. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour mieux caractériser

les relations entre cycle lytique d'EBV, CDBs sur *MYC* et sa relocalisation à proximité d'*IGH*, potentiellement MRE11 dépendante.

3. Que se passe-t-il dans les lymphocytes B d'enfants infectés par EBV et vivant en zones d'endémie ?

Une augmentation significative de la proportion de cellules B circulantes ayant *MYC* et *IGH* colocalisés avait été mise en évidence chez les PVVH, chez qui on pouvait retrouver la protéine Tat sous forme soluble dans le sang circulant, comparés aux cellules B de donneurs sains. En comparant ces mêmes donneurs sains d'origine européenne aux enfants sénégalais, nous avons également obtenu des taux de colocalisation *MYC-IGH* significativement plus élevés chez les enfants. Cependant, il faudra au moins éliminer les biais constitués par la différence d'âge et l'état physiologique pour une interprétation correcte de ces résultats. Ce qui nécessiterait de comparer des enfants sénégalais et européens d'une part et adultes donneurs sains sénégalais et européens d'autre part, dont la seule différence apparente serait le lieu de résidence.

En outre, nous avons voulu savoir si, le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B d'enfants infectés par EBV étaient en rapport avec le statut de l'infection. Une sérologie EBV a été effectuée chez 25 enfants, âgés de 8ans en moyenne et 96% d'entre eux (24/25) avaient une sérologie positive. Ce qui concorde avec la précoce séroconversion à EBV (avant 3ans) initialement décrit chez les enfants africains déjà dans les années 1970 (de-Thé et al., 1978). Dans une cohorte gambienne plus récente, 86% d'enfants âgés de moins de 2ans étaient séropositive à EBV (Jayasooriya et al., 2015). Environ un quart des enfants (7/24) avait un profil sérologique de réactivation ou de primo-infection. La FISH a été effectuée uniquement pour 11 enfants, répartis en trois groupes en fonction de la sérologie EBV. Nous n'avons pas trouvé de différences sur le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans les lymphocytes B circulant des enfants en phase de réactivation comparés à ceux qui sont en phase de latence. L'on pourrait être tenté d'imputer cela à la petite taille de l'échantillon analysé mais à posteriori ces résultats semblent logiques et sont en phase avec ceux obtenus *in vitro*. En effet, la proximité *MYC-IGH* semble être induite dans les cellules infectées par EBV, alors que la proportion de ces cellules circulantes dans le sang périphérique est très faible, environ $1/10^6$ cellules (Nijland et al., 2016). Ainsi la comparaison devrait se faire uniquement avec les cellules B EBV positive. Nous avons

testé différentes techniques pour isoler les cellules B circulantes EBV positives mais avons été confrontés à la limite de leur faible proportion, associé à des artefacts techniques. Le sang périphérique n'est probablement pas le meilleur échantillon pour isoler les cellules B infectées par EBV. En effet, elles sont surtout présentes au niveau des organes lymphoïdes secondaires en particulier les amygdales. On pourrait envisager en collaboration avec les services d'ORL de Dakar de récupérer les pièces opératoires d'amygdalectomie pour réaliser des empreintes sur lames. Une FISH pourra alors être réalisée avec des sondes ciblant *MYC*, *IGH* et le génome d'EBV pour identifier les cellules infectées par EBV et y évaluer le taux de colocalisation *MYC-IGH*.

4. La protéine Tat du VIH-1 induit une expression aberrante du gène AICDA

Notre équipe avait précédemment prouvé l'implication de Tat dans l'induction de la proximité entre *MYC* et *IGH* dans les lymphocytes B circulants *in vitro* et chez les PVVIH. Cependant, pour former la translocation t(8;14), des CDBs simultanées sur les loci *MYC* et *IGH* sont requises. Nous avons ainsi investigué un potentiel lien entre la protéine Tat et l'enzyme AID qui est déjà reconnue comme une actrice principale dans la formation de plusieurs translocations chromosomiques aussi bien dans les cellules B (Küppers and Dalla-Favera, 2001; Liu et al., 2008; Ramiro et al., 2004; Robbiani et al., 2008; Tsai et al., 2008; Wang et al., 2009), que dans des cellules non hématopoïétiques (Lin et al., 2009; Matsumoto et al., 2007; Nonaka et al., 2016; Pauklin et al., 2009). Nous montrons dans ce travail qu'en plus de favoriser cette proximité spatiale entre *MYC* et *IGH*, la protéine Tat induit dans les cellules B périphériques une acétylation du promoteur du gène *AICDA* résultant en une expression aberrante de l'enzyme AID. Il a été récemment démontré par notre équipe que Tat induit cette surexpression d'*AICDA* dans les cellules B via mTORC1 qui inhibe les répresseurs transcriptionnels d'*AICDA* cMyb et E2F8 (Akabay et al., 2021).

Dans les conditions physiologiques, cette enzyme introduit des CDBs sur le locus *IGH* au cours des processus de SHM ou de CSR. Une expression aberrante d'AID introduit des CDBs sur *IGH* comme en témoigne l'augmentation de la colocalisation *IGH-γH2AX* objectivée avec secondairement mise en place de la réponse aux dommages d'ADN et recrutement des protéines de réparation comme MRE11. AID peut également cibler des loci en dehors d'*IGH*,

particulièrement ceux situés à proximité (Rocha et al., 2012). Ce qui explique les triples colocalisations *MYC-IGH-MRE11* mises en évidence témoignant très probablement de dommages d'ADN simultanées sur *MYC* et *IGH* qui partagent un même centre de réparation d'ADN, ce qui pourrait favoriser leur translocation. D'autres mécanismes de surexpression d'AID dans les lymphocytes B ont également été décrit chez les PVVIH, soit par l'activation chronique des lymphocytes B (Imbeault et al., 2011; Martin et al., 2007), soit par effet direct de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 (He et al., 2006).

5. Modèles proposés pour l'origine de la translocation chromosomique t(8 ;14) dans les différentes formes cliniques de Lymphome de Burkitt

⇒ *Lymphome de Burkitt endémique (LBe)*

Jusque-là, trois modèles étaient proposés quant à l'origine de la translocation chromosomique dans le LBe. Dans le premier modèle, la translocation aurait lieu dans la moelle osseuse au moment de la recombinaison V(D)J, suggéré par la position des points de cassures chromosomiques au niveau du segment J du locus *IGH* (Bornkamm et al., 1987; Haluska et al., 1986). Les CDBs seraient alors médiées par les recombinaisons RAG et l'infection à EBV surviendrait secondairement dans les LB matures contenant déjà une translocation, conférant ainsi aux cellules un avantage sélectif. Dans le deuxième modèle, la translocation a lieu dans le CG des organes lymphoïdes secondaires au décours d'une infection à EBV qui active les cellules B, entraînant ainsi leur recrutement dans le CG où l'AID est active. Le troisième modèle suggère une stimulation antigénique ou non spécifique des cellules B qui sont activées et recrutées dans le CG où survient la translocation suivie de l'infection de la cellule par EBV (Allday, 2009). Si l'on considère comme postulat de départ que les CDBs sur *MYC* et *IGH* sont dues à l'action des enzymes RAG ou AID, les deux derniers modèles impliquent, soit une réactivation des RAG dans le CG comme cela a été rapporté dans des cellules B murines (Han et al., 1997; Hikida et al., 1996; Ohmori and Hikida, 1998) ; soit la possibilité pour l'AID, qui normalement intervient sur les régions variables et switch d'*IGH*, d'agir sur les segments J où sont localisées les cassures dans le LBe. Cependant, à notre avis, tous les modèles décrits ci-dessus n'intègre pas d'une part l'infection très précoce des enfants au virus EBV en Afrique, et d'autre part le rôle important joué par le cycle lytique dans la pathogénèse du LBe. Plusieurs arguments confirment en effet l'implication du cycle lytique dans le LBe. *P. falciparum*, le latex d'*E. tirucalli* et potentiellement

l'AFB1, cofacteurs étiologique du LBe, sont tous capables de réactiver le virus EBV *in vivo* et *in vitro* (Accardi et al., 2015; Chêne et al., 2007; MacNeil et al., 2003). De plus, des titres élevés d'IgG anti VCA, synonyme de réactivation (Rochford and Moormann, 2015), sont retrouvés chez les enfants jusqu'à 6 ans avant le développement du LBe (Geser et al., 1982; de Thé, 1997). Coghill et ses collaborateurs ont également mis en évidence dans les sera de LBe un profil sérologique caractérisé par une élévation du taux des IgG dirigés surtout contre les protéines du cycle lytique comparés aux sera d'enfants porteurs sains (Coghill et al., 2020). Ainsi, nos résultats nous permettent de spéculer sur un modèle plus inclusif. Les enfants vivants en zone d'endémie très précocement infectés par le virus EBV sont en même temps très tôt exposés à des facteurs environnementaux capables de réactiver les cellules B mémoires infectées de façon latente. Cette exposition chronique et répétée des enfants à ces facteurs favorise une réactivation beaucoup plus fréquente du virus comparée aux enfants non exposés (Carpenter et al., 2008; Piriou et al., 2009). La réactivation induit la colocalisation *MYC-IGH* et recrute les cellules dans le CG où l'AID est active. En même temps le *P. falciparum* favorise également une expression aberrante d'AID (Capolunghi et al., 2008; Parroche et al., 2007; Potup et al., 2009). Cette proximité *MYC-IGH* associée à une expression d'AID ou une potentielle réactivation des RAG favorise ainsi l'apparition de la translocation. La diminution de l'immunité cellulaire anti EBV induite par *P. falciparum* (Chattopadhyay et al., 2013; Snider et al., 2012), associée à l'expression des protéines EBV comme EBNA1 favorise l'échappement immunitaire de cette cellule mais également la résistance à l'apoptose induite par la surexpression de MYC. Toutes ces conditions favorisant l'émergence d'un clone tumoral (Figure 32).

⇒ **Lymphome de Burkitt associé au VIH (LBv)**

Chez les PVVIH, les modèles proposés initialement proposés suggèrent une stimulation chronique non spécifique des cellules B infectées ou non par le virus EBV (Figure 33A et 33B). Ces cellules sont secondairement recrutées dans le CG où survient la translocation chromosomique sous l'action d'AID. En présence d'EBV, les protéines virales contribuent à acquérir une résistance à l'apoptose induite par MYC. En l'absence d'EBV, des mutations additionnelles par exemple sur *MYC* ou sur l'axe ARF/MDM2/p53 favorise cette résistance à l'apoptose et confère un avantage prolifératif à la cellule. Dans 50% des cas, le LBv est associé au virus EBV et donc, le modèle précédemment décrit pour les enfants africains pourrait également s'appliquer, sachant que la stimulation chronique des cellules B induite par

l'infection à VIH peut favoriser la réactivation du virus EBV dans les cellules latemment infectées (Figure 32B). Par ailleurs, les résultats précédemment publiés par notre équipe et ceux obtenus dans ce travail suggèrent en plus que la protéine Tat sécrétée par les cellules infectées et libérée dans le milieu extracellulaire augmente la probabilité de survenue de la translocation en induisant la proximité de *MYC* et *IGH* et en surexprimant l'AID. Tat peut pénétrer dans des cellules B naïves avant leur recrutement dans le CG ou dans des cellules B du CG (Figure 33B). Nos résultats inspirent également un autre modèle dans lequel la translocation *MYC-IGH* pourrait se développer en dehors du CG (Figure 33C). En effet, Tat libérée dans la circulation, peu pénétrer dans n'importe quelle cellule B en dehors du CG, y induire la colocalisation *MYC-IGH*, la surexpression d'AID et la formation de la translocation. La surexpression de MYC résultant de la translocation suffirait alors à conférer aux cellules le phénotype du CG caractéristique des cellules du LB (Pajic et al., 2001; Polack et al., 1996). Cependant, les cellules du LB ayant déjà muté leur gène d'immunoglobuline, ce modèle impliquerait trois conditions : i) soit que ce modèle ne s'applique uniquement aux cellules B mémoires (Figure 33C) ; ii) soit s'il s'agit de cellules B naïves, une nécessité de leur activation et d'un passage obligé dans les CG où a lieu la SHM (Figure 33B); ii) soit que l'expression aberrante d'AID puisse être à l'origine d'une SHM ectopique en dehors du CG. L'étude du statut mutationnel des gènes d'Ig de cellules B naïves avec une expression ectopique d'AID pourrait permettre de confirmer cette dernière hypothèse.

⇒ ***Lymphome de Burkitt sporadique (LBs)***

Le modèle le moins évident est celui des LBs caractérisés dans la majorité des cas par l'absence des virus EBV et VIH. Certains auteurs suggèrent que EBV joue obligatoirement un rôle dans l'initiation du LB et que les formes de LB EBV négatives résulteraient d'une perte de l'épisode viral au cours de la réplication (Rochford and Moormann, 2015). Cependant, la proximité des loci *IGH* et *MYC* n'est pas exclusivement induite par Tat ou la réactivation du virus EBV. En effet, l'activation des cellules B favorise la relocalisation de *MYC* dans l'usine de transcription occupée par *IGH* (Sklyar et al., 2016). Il est donc envisageable que la t(8;14) soit un accident qui pourrait survenir spontanément au cours du processus de différenciation et de maturation d'une cellule B normale, sans EBV ni VIH (Figure 33A). En l'absence d'un avantage sélectif, ces cellules sont normalement éliminées par apoptose. L'acquisition de cet avantage de sélection peut être secondaire à des mutations additionnelles en l'occurrence sur *MYC* ou sur *TP53* permettant à

la cellule de résister à l'apoptose (Adhikary and Eilers, 2005; Eischen et al., 1999; Hemann et al., 2005; Kelly and Rickinson, 2007; Lindström and Wiman, 2002). En effet, il est admis que les LB sporadiques EBV négatif accumulent beaucoup plus de mutations génétiques (Grande et al., 2019) qui en un sens compensent l'absence du virus (Hutcheson et al., 2020). Cependant, en l'absence des virus EBV et VIH, la probabilité d'acquérir dans une même cellule la t(8;14) associée à d'autres mutations additionnelles semble minime. Ce qui expliquerait probablement la faible prévalence des LBs.

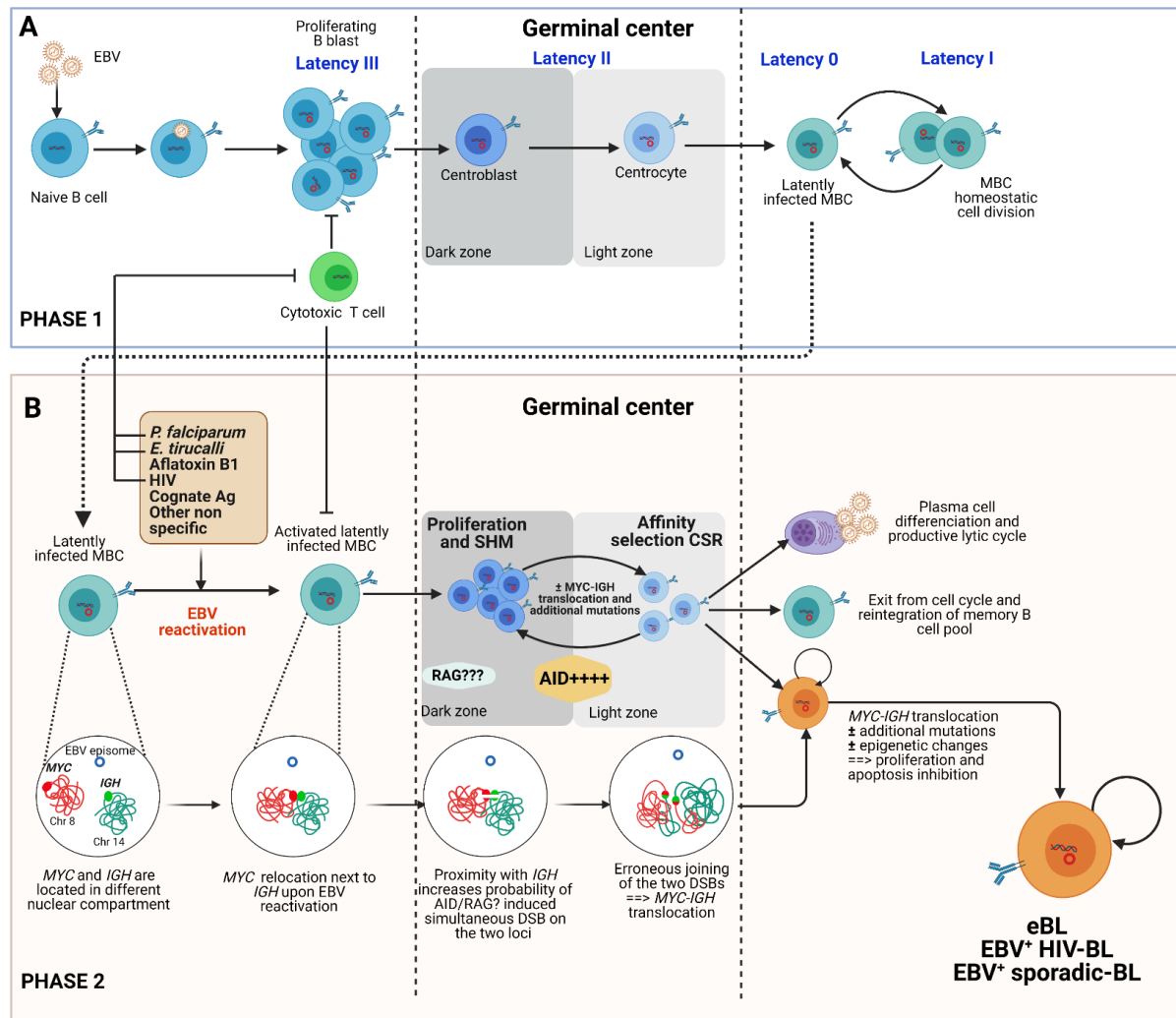


Figure 32: Modèle proposé pour les LB EBV positifs

A (Phase 1) : Infection par EBV (qui survient très tôt avant 3ans chez les enfants en zone d'endémie) et établissement de la latence dans les lymphocytes B avec successivement i) une phase de prolifération avec le programme de croissance (latence III) ; ii) passage dans le CG avec différenciation en centroblaste puis centrocyte : c'est le programme par défaut (latence II) ; iii) sortie du CG et différenciation en cellule B mémoire qui contient l'épisme du virus sous forme latente sans expression de protéine virale (latence 0) ; iv) expression occasionnelle d'EBNA-1 au cours de la division cellulaire (latence I). **B (Phase 2) :** L'exposition des cellules B mémoires infectées de façon latente à certains facteurs (*P. falciparum*, *E. tirucalli* et AFB1 en zone d'endémie ; VIH chez les PVVIH ou une stimulation antigénique ou non spécifique) favorise la réactivation du virus EBV qui induit une relocalisation de *MYC* à proximité d'*IGH*. Cette cellule réactivée est recrutée dans le CG où est exprimée l'AID et potentiellement les RAG pour la SHM et la CSR : i) soit la cellule se différencie en plasmocyte et active le cycle lytique productif ; ii) soit elle rejoint le pool des cellules B mémoires ; iii) soit des cassures doubles brins simultanées sur *MYC* et *IGH* peuvent survenir, suivi de la translocation entre les deux loci. La surexpression de *MYC* découlant de la translocation maintient la cellule en prolifération et des mutations additionnelles, des modifications épigénétiques associées à l'expression de la protéine EBNA1 permettent l'échappement à l'apoptose normalement induite par une surexpression de *MYC* et la persistance du clone tumoral. Certains des facteurs qui réactivent le virus (*P. falciparum*, *E. tirucalli* et le VIH inhibent la réponse T cytotoxique anti-EBV. La possibilité de réexpression des RAG dans le CG reste hypothétique. Les LB sporadiques ne sont pas exposés à ces facteurs environnementaux qui induisent des cycles répétés de réactivation du virus, expliquant peut-être la rareté des LB sporadiques associés à EBV.

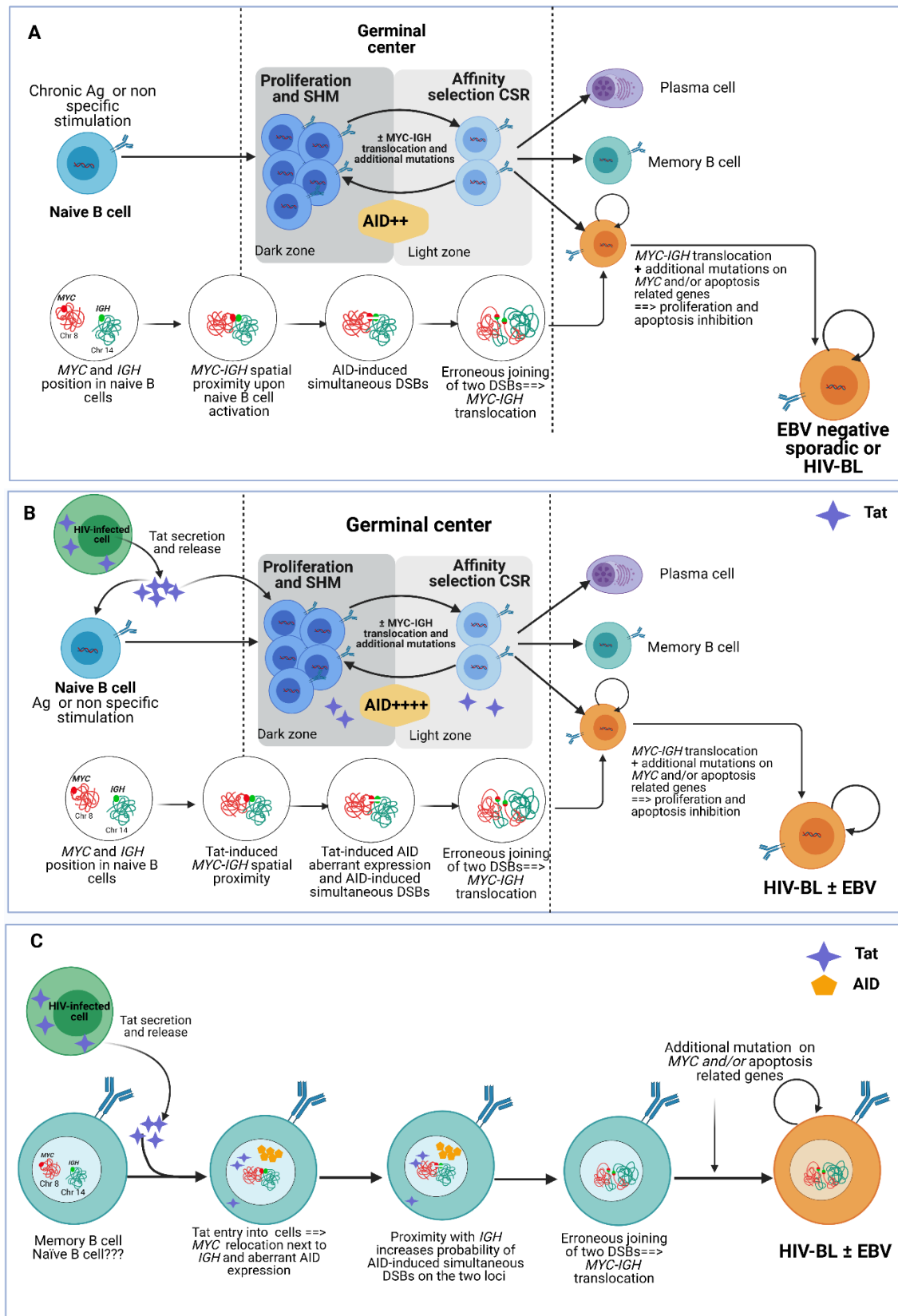


Figure 33: Modèle alternatif pour les LB sporadiques et associés au VIH

(A) = Modèle classique pour les LBs et LBv EBV négatif qui suit le même principe que le modèle de la figure 32A à la différence qu'il n'y a pas de virus EBV. Le point de départ ici est une stimulation d'une cellule B naïve qui est activée et recruté dans le CG. En situation normale, cette cellule après prolifération, SHM et éventuellement CSR se différencie en plasmocyte ou en cellule B mémoire. Cependant, l'activation des cellules B naïves peut favoriser la

relocalisation de *MYC* à proximité d'*IGH*, augmentant le risque de survenue de la translocation *MYC-IGH* dans le CG en présence d'AID et l'émergence d'un clone. En l'absence d'EBV, des mutations additionnelles sont nécessaires pour maintenir la prolifération et l'échappement à l'apoptose. La probabilité de survenue de tous ces événements dans la même cellule reste faible. **(B)** = Modèle de LBv où la protéine Tat libérée par les cellules infectées peut pénétrer, soit dans les cellules B naïves qui seront secondairement recrutées dans le CG au décours d'une stimulation ; soit directement dans les cellules B du CG (centroblastes ou centrocytes). Dans ces cellules, Tat induit une proximité de *MYC* et *IGH* associée à une expression aberrante d'AID favorisant ainsi la formation de la translocation. Ces événements peuvent survenir indépendamment de la présence d'EBV et des mutations additionnelles vont favoriser l'échappement à l'apoptose et la persistance du clone tumoral. **(C)** Nouveau modèle le LBv où la translocation survient en dehors du CG. La protéine Tat libérée par les cellules infectées par le VIH peut pénétrer dans des cellules B mémoires (infectées par EBV ou pas) sans les activer et donc elles ne sont pas recrutées dans le CG. Tat y induit une proximité spatiale de *MYC* et *IGH* associée à une expression aberrante d'AID, suffisantes pour favoriser la translocation *MYC-IGH*. Des mutations additionnelles induites par AID sur *MYC* ou d'autres gènes importants tels que p53 favorisent la persistance du clone tumoral. Etant donné que les cellules de LB ont déjà muté leurs gènes d'Ig ce modèle peut être envisagé sur les cellules B naïves en dehors du CG seulement si l'expression aberrante d'AID suffit à induire une SHM ectopique en dehors du CG. Dans ce modèle-ci, c'est la surexpression de *MYC* qui conférerait aux cellules un phénotype des cellules du CG qui caractérise les cellules du LB (Voir texte pour plus de détails)

Conclusion et perspectives

L'objectif général de ma thèse était d'investiguer le rôle des virus EBV et VIH dans la survenue de la translocation t(8;14) qui caractérise 80% des lymphomes de Burkitt et qui implique l'oncogène *MYC* sur le chromosome 8 et le gène des chaînes lourdes d'immunoglobuline *IGH* sur le chromosome 14.

Nous avons ainsi dans une première partie, fait une revue de littérature afin de préciser certaines notions utiles pour la compréhension de notre sujet mais également de faire un état des lieux sur les données existantes relatives à cette thématique. Nous avons d'abord proposé un 1er chapitre sur le contenu et l'architecture du noyau interphasique des cellules où survient les translocations chromosomiques, ce qui nous a permis dans le deuxième chapitre de mieux aborder les mécanismes de survenue de ces dernières. Dans les chapitres 3 et 4, nous avons vu respectivement les virus EBV et VIH en insistant entre autres sur leurs propriétés oncogéniques. Nous avons alors terminé cette première partie par un chapitre sur le LB qui, apparaît comme une pathologie multifactorielle résultant d'un remodelage de l'architecture du noyau des cellules B à l'origine de la translocation chromosomique, souvent dans un contexte d'infection virale à EBV et /ou VIH. Deux revues, la première portant sur l'effet des virus EBV et VIH sur l'organisation de l'architecture nucléaire des lymphocytes B ; la deuxième sur les propriétés oncogéniques du cycle lytique du virus EBV ont été publiées durant notre thèse et présentées dans cette première partie.

Les travaux de recherche expérimentale ont été présentée dans la deuxième partie. Les expériences effectuées avec la méthodologie décrite nous ont permis d'obtenir des résultats très intéressants.

Nous avons d'une part pu montrer pour la première fois que la réactivation du virus EBV dans les lymphocytes B favorisait la proximité de *MYC* et *IGH*. Nous avons en plus, en utilisant des modèles cellulaires expérimentaux basés sur la technologie CRISPR/Cas9 montré que cette proximité augmentait effectivement leur probabilité de translocation. Des CDBs spécifiques sur *MYC* semblent être le facteur déclenchant sa relocalisation à proximité d'*IGH*, médiée par la protéine MRE11. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir de données concluantes avec les échantillons des enfants sénégalais en ce qui concerne le taux de colocalisation *MYC-IGH* dans leurs cellules B en fonction du profil de leur sérologie EBV.

D'autre part nous avons pu fournir des arguments supplémentaires quant à l'implication de la protéine Tat du VIH-1 dans la formation de la t(8;14). En plus de l'induction de la proximité entre *MYC* et *IGH* précédemment décrite par notre équipe, nous avons montré ici que Tat induisait une expression aberrante du gène *AICDA* dans les lymphocytes B, ce qui associée à la proximité *MYC-IGH* augmente le risque de CDBs simultanées et donc de translocation.

Cependant, même si ces résultats apportent de la lumière sur les mécanismes de formation de la t(8 ;14), beaucoup de zones d'ombre persistent, surtout pour le virus EBV et constituent des perspectives de recherche.

Même si nos données montrent que la réactivation d'EBV induit des CDBs sur *MYC* et en conséquence sa relocalisation vers *IGH*, nous ne savons pas à l'heure actuelle, pourquoi spécifiquement *MYC*, ni par quel(s) mécanisme(s).

Nos résultats suggèrent un modèle de LB dans lequel la translocation a pour origine les cellules B mémoires infectées de façon latente par le virus EBV et qui au décours d'une stimulation (antigénique ou non spécifique) effectue un cycle lytique abortif au cours duquel survient la translocation. Cependant, une meilleure connaissance des mécanismes du cycle lytique abortif *in vivo*, notamment le circuit de la cellule réactivée depuis sa stimulation jusqu'à son retour en état de latence, permettrait une modélisation plus précise du rôle du cycle lytique d'EBV dans la pathogénèse du LB.

Il serait également intéressant de pouvoir mettre en parallèle les données obtenues *in vitro* sur la réactivation du virus EBV avec celles des enfants infectés et vivant en zone d'endémie. Les cellules B circulantes n'étant pas l'échantillon approprié pour isoler les cellules EBV positives, nous orientons nos réflexions vers la possibilité de les isoler à partir des organes lymphoïdes secondaires des porteurs sains. Les considérations éthiques et morales limitent cette option mais l'accès aux pièces d'amygdalectomie d'enfants nous paraît envisageable.

Par ailleurs, une meilleure compréhension des mécanismes de développement des pathologies devrait entre autres, aboutir à la mise en place de stratégies thérapeutiques curatives ou préventives. Dans ce sens, les modèles cellulaires développés dans le laboratoire et qui produisent des translocations de façon inductible et détectable, nous semble être un outil

adéquat pour faire un criblage de potentiels molécules capables de réduire voire inhiber la formation des translocations chromosomiques.

Annexes

1. Liste des publications

1. Sall FB, Shmakova A, Tsfasman T, Lomov N, Touré AO, Wiels J, Lipinski M, Dokudovskaya S, Germini D, Vassetzky Y. Epstein-Barr Virus reactivation induces *MYC-IGH* spatial proximity and Burkitt's lymphoma translocation in infected B cells. (en préparation)
2. Germini D, **Sall FB**, Shmakova A, Wiels J, Dokudovskaya S, Drouet E, Vassetzky Y. Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers* (Basel). 2020 Jun 5;12(6):1479.doi: <https://10.3390/cancers12061479>
3. **Sall FB**, Pichugin A, Iarovaia O, Barat A, Tsfasman T, Brossas C, Prioleau MN, Lazarovici J, Camara-Clayette V, Ribrag V, Lipinski M, Vassetzky Y, Germini D. Large-scale nuclear remodeling, and transcriptional deregulation occur on both derivative chromosomes after Mantle Cell Lymphoma chromosomal translocation. *BioRxiv*. 2019. doi: <https://doi.org/10.1101/2019.12.30.882407>
4. **Sall FB**, El Amine R, Markozashvili D, Tsfasman T, Oksenhendler E, Lipinski M, Vassetzky Y and Germini D.HIV-1 Tat protein induces aberrant activation of AICDA in human B lymphocytes from peripheral blood. *Journal of Cellular Physiology*, 2019 doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.28219>
5. **Sall FB**, Germini D, Kovina A, Ribrag V, Wiels J, Touré AO, Iarovaia OV, Lipinski M, and Vassetzky Y. Effect of environmental factors on the nuclear organization and transformation of human B lymphocytes *Biochemistry*, 2018. doi: <https://doi.org/10.1134/S0006297918040119>

2. Liste des communications orales

1. **Sall F.B.**, Germini D, Shmakova A, Wiels J, Touré A.O and Vassetzky Y. Does Epstein-Barr Virus play a direct role in Burkitt Lymphoma specific translocation? *International Conference on Innovative Solution: Cancer, Aging on Genetic Disease, October 2020, online conference*
2. D. Germini, **FB. Sall**, V. Khammad and Y. Vassetzky. Nuclear organization affects B-cell lymphomagenesis. *26th Wilhelm Bernard International Workshop on the Cell Nucleus 2019*, Dijon, France.
3. **Sall FB**, Germini D, Wiels J, Touré AO, Vassetzky Y. Colocalisation *MYC-IGH* chez les enfants africains infectés par EBV et conséquences de cette colocalisation sur le taux de translocation *MYC-IGH in vitro*. *HerPAs 2019, XIII^{ème} journée scientifique Herpes Virus et pathologies associées*, Lyon, France.
4. Germini D, **Sall FB**, Lipinski M, Vassetzky Y. L'induction du cycle lytique d'EBV induit une relocalisation des gènes dans le noyau et favorise les translocations chromosomiques. *HerPAs 2019, XIII^{ème} journée scientifique Herpes Virus et pathologies associées*, Lyon, France

3. Liste des communications affichées

1. Germini D, **Sall FB**, Khammad V, Vassetzky Y. HIV-1 transactivator protein Tat induces Burkitt Lymphoma by affecting nuclear organization of B-cells. *ESH 5th international conference new concepts in lymphoid malignancies 2019*, Estoril, Portugal
2. **Sall FB**, Germini D, Shmakova A, Wiels J, Ndour M, Touré AO, Vassetzky Y. Role of Epstein-Barr virus reactivation in translocation t(8;14) genesis. *26th Wilhelm Bernard International Workshop on the Cell Nucleus 2019*, Dijon, France.
3. Germini D, **Sall FB**, Markozashvili D, Pichugin A, Camara-Clayette V, Ribrag V, Lipinski M, Vassetzky Y. Large-scale chromatin remodelling and transcriptional deregulation on der11 following translocation in Mantle Cell Lymphoma. *26th Wilhelm Bernard International Workshop on the Cell Nucleus 2019*, Dijon, France.
4. **FB. Sall**, D. Germini, A. Shmakova, J. Wiels, PMD. Diouf, AO Touré, Y. Vassetzky. EBV-induced spatial proximity between the *MYC* and *IGH* loci increases t(8;14) translocation rate. *15èmes Journées Scientifiques de l'Ecole Doctorale de Cancérologie 2019*, Station Biologique de ROSCOFF, France.
5. Germini D, **Sall FB**, Vassetzky Y. Screening system for drugs with a capacity to prevent HIV-related lymphomas. *R&D international dating 2018*, Paris, France

4. Article 5 : Remodelage nucléaire à grande échelle et dérégulation transcriptionnelle sur les deux chromosomes dérivés après la translocation chromosomique du Lymphome de Manteau

Le lymphome à cellules du manteau (MCL) est un autre LNH agressif développé aux dépens des cellules B de la zone marginale des follicules lymphoïdes. Il est caractérisé sur le plan moléculaire par une translocation chromosomique $t(11;14)(q13;q32)$ impliquant le gène des chaînes lourdes d'Ig *IGH* sur le chromosome 14 et le gène *CCND1* sur le chromosome 11, codant pour la cycline D1 (CCND1), un régulateur du cycle cellulaire, favorisant la transition G1/S. Comme pour *MYC* dans la $t(8;14)$ du LB, la $t(11;14)$ juxtapose *CCND1* sous le contrôle des puissants promoteurs d'*IGH*, résultant en une surexpression de la CCND1, normalement non exprimée dans les cellules B quiescentes. La surexpression de la CCND1 joue un rôle important dans l'oncogenèse du MCL. Cependant, une expression ectopique de la CCND1 n'est pas suffisante pour induire le développement d'une tumeur suggérant l'existence d'autres événements oncogéniques à type de mutations ou d'altération de l'expression d'autres gènes. La dérégulation transcriptionnelle de gènes peut résulter d'une activation anormale sous le contrôle d'un puissant promoteur comme observé pour *CCND1* sur le chromosome dérivé 14. Mais elle peut également résulter d'un remodelage de l'architecture nucléaire découlant de la translocation chromosomique, et amenant des loci à s'associer avec des compartiments nucléaires transcriptionnellement actifs comme les usines de translocation ou le nucléole par exemple. Dans ce travail, nous nous sommes focalisés sur l'expression d'autres gènes situés à proximité du point de cassure chromosomique ainsi que l'étude de leur positionnement dans l'espace nucléaire avant et après la $t(11;14)$ en se focalisant sur le chromosome dérivé 11. Nous avons ainsi identifié, à la fois avec des lignées cellulaires de lymphome du manteau et chez des patients MCL, 88 gènes communément dérégulés et situés sur le chromosome dérivé 11, aux environs des points de cassure de la translocation. Plus intéressant encore, nous avons trouvé que le segment du chromosome 11 contenant ces gènes était relocalisé de la périphérie vers le centre du noyau, à proximité du nucléole où la protéine nucléolaire nucléoline pourrait se lier à ces gènes et activer leur expression. Ces résultats contribuent ainsi à l'identification de potentiels oncogènes impliqués dans la pathogenèse du LM ainsi que les mécanismes de leur dérégulation transcriptionnelle.

Large-scale nuclear remodeling and transcriptional deregulation occur on both derivative chromosomes after Mantle Cell Lymphoma chromosomal translocation

Fatimata Bintou Sall^{1,2}, Andrei Pichugin¹, Olga Iarovaia³, Ana Barat¹, Tatyana Tsfasman¹, Caroline Brossas⁴, Marie-Noëlle Prioleau⁴, Julien Lazarovici⁵, Valérie Camara-Clayette⁶, Vincent Ribrag^{5,7}, Marc Lipinski¹, Yegor Vassetzky^{1,8} and Diego Germini^{1,9}

¹ UMR9018, Université Paris-Saclay, CNRS, Gustave Roussy, Villejuif, France;

² Laboratoire d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire Aristide Le Dantec, Université Cheikh Anta Diop, Dakar, Senegal;

³ Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

⁴ UMR7592, Université Paris Diderot, CNRS, Institut Jacques Monod, Paris, France;

⁵ Département d'Hématologie, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France;

⁶ AMMICa INSERMUS23/CNRS UMR3655, Translational Hematology Unit, Gustave Roussy, Villejuif, France;

⁷ Département des Innovations Thérapeutiques et Essais Précoces, Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Villejuif, France;

⁸ Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁹ Corresponding author: germinidiego@gmail.com

ABSTRACT

Recurrent chromosomal translocations are found in many blood and solid cancers. Balanced translocations, frequent in lymphoid malignancies, lead to the formation of two aberrant derivative (der) chromosomes. This event often leads to overexpression of an oncogene. In many cases, the expression of an oncogene is not enough to produce a malignant phenotype; however, most part of the studies focus on the events involving the chromosome where the oncogene is located, but rarely the other der chromosome where other oncogenic alterations may potentially arise. Mantle cell lymphoma (MCL), an aggressive B-cell non-Hodgkin lymphoma, is a perfect example of this. In 85% of the cases, it is characterized by the translocation t(11;14), which leads to the overexpression of cyclin D1 (*CCND1*) gene which results juxtaposed to the immunoglobulin heavy chain (*IGH*) gene on the der14 chromosome. This feature alone is not sufficient to induce oncogenesis. Here we focused on the der11 chromosome. We demonstrated that expression of 88 genes located in a 15mb region close to the translocation breakpoint on the der11 was deregulated both in the GRANTA-519 MCL cell line and in B-cells from MCL patients. We found that a large segment of der11 containing deregulated genes was relocated from its normal position in the nuclear periphery towards the center of the nucleus in close proximity to the nucleolus where the abundant nucleolar protein nucleolin binds a subset of genes located close to the breakpoint and activates their expression. This finding allowed to identify new potential oncogenes involved in MCL and the mechanisms of their upregulation.

INTRODUCTION

Mantle cell lymphoma (MCL) is a non-Hodgkin lymphoma characterized by an uncontrolled proliferation of the B-cells located in the outer edge of a lymph node (mantle zone). It represents 8% of all lymphomas in Europe (Vose, 2017). It has a poor prognosis with an average survival rate of five years (Skarbnik and Goy, 2015). Despite significant advances in treatment (Camara-Clayette et al., 2012), MCL still remains an incurable disease (Campo and Rule, 2015). Moreover, its annual incidence has increased during recent decades (Epperla et al., 2017).

It is characterized by a specific t(11;14)(q13; q32) (Bentz et al., 2000; Li et al., 1999) translocation where the 11q13 region (encoding for over 300 genes) is recombined with the Immunoglobulin Heavy Chain (*IGH*) locus on chromosome 14.

This translocation leads to the over-expression of the gene encoding for the G1/S specific Cyclin D1 (*CCND1*) that is not expressed in quiescent B lymphocytes (Bosch et al., 1994; Dreyling et al., 1997).

However t(11;14) can be also detected in healthy people's blood cells (Hirt et al., 2004) and expression of *CCND1* under the control of different known *IGH* enhancers in transgenic mice is not sufficient for tumor development (Fiancette et al., 2010; Lovec et al., 1994). Indeed it seems that *CCND1* is not the only gene affected in MCL and recurrent mutations are found in other genes belonging to different pathways and cellular processes e.g. cell cycle (*ATM*), epigenetic regulation (*MLL2* and 3), NF-κB pathway (*BIRC2* and 3) (reviewed in (Ahmed et al., 2016)). Some MCL cases exist lacking *CCND1* overexpression but carrying secondary alteration as *SOX11* overexpression (Jares et al., 2012). These data point out that additional oncogenic alterations are necessary to develop a malignant phenotype.

Data previously obtained in our laboratory show that the *CCND1* locus, normally located at the periphery of the nucleus, after the t(11;14), in MCL cell lines or in lymphoma cells from patients, is regularly found close to the center of the nucleus and/or associated to the nucleolus. In the surroundings of the nucleolus, *foci* of active polymerase II, therefore regions of transcriptionally active chromatin, and a range of potential transcription factors have been found. For instance nucleolin, a major nucleolar protein, which forms, together with hnRNP D, the B cells-specific heterodimeric transcription factor LR1, may be involved in activation of oncogenes in lymphomas (Allinne et al., 2014).

Following a chromosomal translocation, changes in spatial gene localization and nuclear reorganization occur, inducing alterations in gene expression and potentially leading to additional events necessary for oncogenesis (reviewed in (Harewood and Fraser, 2014)). In the present work, we looked for possible oncogenic modifications in genomic regions other than the *CCND1* and the der14 chromosome and we focused our attention on the events involving the der11 chromosome where only a small portion of the chromosome 14 is translocated.

We describe here new features specific of MCL and potentially linked to the malignant transformation. We have shown in MCL cells (*in vitro* and from MCL patients) a massive deregulation of the expression of genes located on the chromosome 11 close to the translocation breakpoint. Most of these genes were located on the der11 after the t(11;14). We explained this event by showing that the der11 chromosome is relocated in close proximity to the nucleolus where the nucleolin directly binds to chromatin, modulating gene expression. The same nuclear reorganization was also found in B-cells from MCL patients harboring the t(11;14). Our results describe novel genomic and transcriptomic alterations for MCL, a possible role played by nucleolin in inducing potential lymphomagenic alterations and provide potential new targets for the amelioration of the prognosis for MCL.

RESULTS

Analysis of clustered gene expression in MCL reveals a large domain of upregulated genes adjacent to the translocation point on der11 chromosome.

We first wanted to determine whether the t(11;14) perturbs the expression of genes other than *CCND1* in the vicinity of the translocation breakpoint.

We have performed RNA-seq of MCL cell lines (GRANTA-519, carrying the t(11;14)) and RPMI8866 lymphoblastoid cell lines (LCL) used as a control. Gene expression in GRANTA-519 was compared to LCL RPMI8866 and the genes significantly upregulated (adjusted p value<0.05) were mapped on each chromosome. We found that a total of 286 genes were significantly upregulated on the chromosome 11. After the translocation, the portion of genes located on der11 in close proximity to the *CCND1* (**Figure 1A**, in green) shows a more deregulated pattern as compared to the genes located on the der14 (**Figure 1A**, in red). Dividing the chromosome 11 in equal portions of 15mb, we found that the greatest percentage of upregulated genes was located in the region surrounding the translocation breakpoint compared to the rest of the chromosome (**Figure 1B**). That region contains genes mainly located on the der11. Such a relatively high transcriptional deregulation region cannot be found within other chromosomes (**Supplementary Figure 1**).

Replication timing of genomic regions correlates with gene transcription and changes in nuclear position. Active transcription coincides with a switch from late to early replication timing (Rhind and Gilbert, 2013; Rivera-Mulia et al., 2015). In order to verify this correlation in our experimental model, we analyzed the DNA replication timing in GRANTA-519 and in LCL RPMI8866 as a control. Cells labeled with BrdU were sorted into two S-Phase fractions (early and late S-Phase) and immunoprecipitated with an anti-BrdU antibody, amplified, differentially labeled, and co-hybridized onto a whole human genome oligonucleotide microarray. The replication-timing profile represented here is obtained by the log₂-ratio of the abundance of each genomic probe in the early and late S-phase fractions, revealing early and late replicated domains.

We observed a significant shift to early replication timing surrounding the *CCND1* gene in GRANTA-519 (purple lines) in contrast to the LCL RPMI8866 (blue lines) (**Figure 1C**). This 10 Mb modified region (black arrow in **Figure 1C**) moves from a late S-Phase to a Mid-S-Phase replication timing (**Figure 1C**).

The replication timing modification covers a wide region upstream and downstream the *CCND1* gene covering from the 11q13.2 to the 11q13.4 loci. This region coincides to the one

where the massive gene deregulation was observed in the RNA-seq, thus supporting our data. The replication timing profile at the *CCND1* locus corresponds to an average of the replication timing of the two alleles (wild type and translocated), leading to an underestimation of the replication timing shift due to the translocation. For this reason, we can assume that the replication timing of the translocated allele of chromosome 11 at the translocation breakpoint moves from late-S-phase to early-S-phase, while the other allele keeps the same late replication timing as the LCLRPMI8866.

To understand if the data obtained *in vitro* has relevance *in vivo*, we performed RNA-seq on B-cells purified from four MCL patients in leukemic phase. Eighty-eight genes were commonly upregulated in GRANTA-519 and in the four patients compared to the LCLRPMI8866 (**Figure 2**). Forty-eight percent of them (42 genes) were located in the same 15mb region surrounding the translocation breakpoint while the remaining 52% was distributed throughout the whole chromosome 11 (**Figure 2**).

Among the deregulated genes located on the der11 close to the breakpoint there are several that has been correlated to multiple cancer development such *MEN1* implied in chromatin remodelling, *RAD9A* involved in DNA damage response, *CTSF* involved in apoptosis regulation (Bassi et al., 2016; Covington and Fuqua, 2014; Ji et al., 2017; Lee et al., 2004), *GSTP1* found deregulated in other cases of MCL and implicated in the cell detoxification from xenobiotics (Yuan et al., 2008).

This global overexpression pattern specific of MCL describes transcriptional alterations other than *CCND1* and can hardly be explained by the action of a single enhancer but rather could be a result of a large-scale post-translocation modification. Alterations in the nuclear position of chromosomal loci can explain such transcriptional modifications due to a newly acquired vicinity to nuclear region rich in transcriptional factor or transcriptionally active as the nucleolus. Thus, we next investigated the nuclear positioning of translocated and non-translocated loci.

Der11 chromosome relocates next to the nucleolus after the t(11;14).

We have studied, using the immuno-3D-FISH technique, the nuclear organization in MCL (GRANTA-519) and control cell lines LCL RPMI8866 and its changes after the t(11;14). Der11 chromosome was visualized in 3D-FISH as colocalized signals of *GSTP1* gene locus (colored in green) located on chromosome 11 upstream to the translocation breakpoint and the telomeric portion of the chromosome 14 ("Tel14*IGH*" - in red) (**Supplementary Figure 2**).

We divided the nucleus in 10 concentric volumes where the volume "1" represents the periphery of the nucleus and the volume "10" represents its center. As shown in **Figure 3A** (top panels) in control cells LCL RPMI8866, in the absence of t(11;14), the *GSTP1* locus is mostly found between the center and the periphery of the nucleus (being mostly located in volume "5") while the *IGH* locus is closer to the nucleus center (mostly located in volumes "7, 8"). In GRANTA-519 cells the same loci located on the der11 chromosome relocate as compared to control cells, both moving towards the nucleus center (mostly located in volumes "8-9", **Figure 3A** bottom panels).

We have previously shown that in MCL and other cancer cells, the perinucleolar region is enriched in active transcription zones called «transcription factories» (Allinne et al., 2014; Razin et al., 2011). The movement towards transcriptional active areas could correlate with transcriptional deregulation as that observed in genes located on the der11. Thus, we checked if the *GSTP1* movement in the nuclear space after the translocation corresponds to a relocalization towards the nucleolus. We measured and compared the distance of each *GSTP1* signal colocalized, in GRANTA-519 (der11), and not colocalized, in LCL RPMI8866, with Tel14*IGH* to the closer nucleolus (visualized by staining the major nucleolar protein, nucleolin). We found that in GRANTA-519 cells the percentage of cells where the *GSTP1* locus on der11 is closer than 1µm to the nucleolus is significantly higher than in control LCL RPMI8866 (74.2±3.5 vs 27.6±4.7) (**Figure 3B**). A representative 3D-FISH image of this event is shown in **Figure 3C**. Also the average distance from the nucleolus of the *GSTP1* loci on the der11 is 0.73±0.04 µm which is significantly closer compared to normal LCL RPMI8866 (average distance=1.94±0.07 µm) (**Supplementary Figure 3**).

The demonstrated relocalization in the nuclear space of the loci on the der11 chromosome close to the nucleolus can potentially expose them to a transcriptional activation and to the action of transcription factors that can explain the overexpression of the cluster of genes in MCL described above.

Der11 proximity to the nucleolus is present also in circulating MCL B-cells from patients.

To understand whether our *in vitro* findings could be relevant to clinical conditions, we then focused our attention on circulating B-cells isolated from MCL patients. The comparison between the position of the der11 and the non-translocated loci within the same sample was performed as described above by using the 3D-FISH technique. In three out of four MCL

patients the percentage of *GSTP1* signals located at less than 1 μ m from the nucleolus is significantly higher for the loci on the der11 than on the intact 11 chromosome (**Figure 4A**). Considering the means of all the four patients, the percentage of the *GSTP1* signals closer than 1 μ m to the nucleolus is higher when *GSTP1* is on der11 than when is on the intact chromosome 11 (53.5 $\pm$ 5.7% vs 44.5 $\pm$ 4.1%, respectively) (**Figure 4B**). These results obtained from B-cells purified from MCL patients support the previously described *in vitro* results.

Nucleolin activates the transcription of der11 overexpressed genes

LR1 is a B-cell-specific transcriptional factor, binding a known DNA consensus sequence GNCNAG(G/C)CTG(A/G) (Hanakahi et al., 1997) and capable of regulating transcription in activated B-cells. LR1 is composed by two polypeptides of 106 and 45 kDa. The 106 kDa component is the nucleolin (Hanakahi et al., 1997).

Thus, we wanted to understand if the newly acquired proximity to the nucleolus and, consequently, to the nucleolin of the der11 chromosome could play a role on regulation of gene transcription.

We have performed ChIP-seq analysis targeting nucleolin on GRANTA-519 and LCL RPMI8866. Binding site analysis performed using MEME (Bailey and Elkan, 1994) revealed a motif consistent with the published one and a novel one (**Supplementary Figure 4**). Bioinformatic and Integrated Genome Viewer analysis revealed peaks corresponding to nucleolin binding sites in the same 15 mb region where the massive gene expression regulation was found. The number of peaks found in that region in LCL RPMI8866 and GRANTA-519 did not differ significantly (~32 on average between the two replicates). Nevertheless, peaks present only in GRANTA-519 were found in correspondence of significantly upregulated genes (**Figure 5**). Interestingly those genes were clusterized at the beginning (e.g. *CD6*), in the middle (e.g. *EHD1*) or close to the *CCND1* (e.g. *CPT1A*) of the 15 mb region.

To further confirm the transactivating role of nucleolin, we ectopically expressed GFP-nucleolin in HEK cells. GFP⁺ cells were sorted, and the expression of genes located in the 15 mb region and commonly deregulated in GRANTA-519 cells and the four MCL patients was analyzed and compared to non-transfected HEK. In transfected cells the expression of the gene encoding for the nucleolin was 210.4 $\pm$ 38.3 fold higher than non-transfected HEK (**Figure 6A**). The presence of a higher amount of nucleolin significantly increased the

expression of *CD6*, *PYGM*, *CTSF* and *CPT1A* (**Figure 6B**). In correspondence of *CD6* and *CPT1A*, peaks in ChIP-seq analysis were also found. The expression of genes located on the chr11 (*DAK* and *RTN3*) or on other chromosomes (*SOD1* and *RUNX1T1*) that was unaffected in the RNA-seq remained unchanged in transfected HEK (**Figure 6B**, rightmost histograms), thus confirming the specific effect of the nucleolin.

DISCUSSION

Chromosomal translocations are the result of two simultaneous DNA double-strand breaks in different chromosomes followed by reciprocal erroneous rejoining of DNA ends. In the case of balanced translocations, frequent in lymphoid malignancies, two aberrant chromosomes are formed and called derivative (der) chromosomes (Lieber, 2016). Recurrent chromosomal translocations are found in blood and certain solid tumors.

After a translocation one of the most recurrent effects is the overexpression of an oncogene following its juxtaposition with a highly expressed gene. This is the case for example for Burkitt lymphoma, Follicular lymphoma or Mantle cell lymphoma where *MYC*, *BCL2* and *CCND1*, respectively, result overexpressed following their erroneous joining next to an immunoglobulin gene locus. These recurrent chromosomal aberrations often serve as a marker of the tumor.

The presence of a translocation does not inevitably mean oncogenic transformation, indeed genomic translocations are also found in healthy individuals, thus meaning that additional mutations and alterations are required to produce a malignant phenotype (Aplan, 2006). At the same way also oncogene overexpression occurring after the translocation is not enough to produce a malignant phenotype and additional alterations should arise (Grumolato and Aaronson, 2014).

This is true for MCL for which it has been demonstrated that *CCND1* (located on the chromosome 11) alone is not enough to induce the malignant transformation and additional alterations involving cell cycle, DNA damage response or epigenetic modifications are required (Peterson et al., 2019). An understanding of the events and the mechanisms leading to lymphomagenesis is still lacking.

We have found that common genes are deregulated *in vitro* and in MCL patients on the chromosome 11 and half of them was concentrated in a relatively small region of 15 Mb next to the translocation breakpoint.

Among the deregulated genes we found genes implicated in DNA damage and repair (*ATM*, *MRE11* and *RAD9A*) or others that has already been described as deregulated or markers or mutated in lymphomas or other cancers (*AHNAK*, *CD6*, *CTSF*, *CPT1A*, *MEN1*) or associated to B-cells proliferation (*CYB561A3*, *MAP3K11*) (Hartmann et al., 2008; Hoster et al., 2008; Knackmuss et al., 2016; Melone et al., 2018; Pasqualucci et al., 2011; Rizzatti et al., 2005; Thieblemont et al., 1999).

Consistently with other studies, also the glutathione S-transferases P1 gene (*GSTP1*) gene was upregulated. Proteins from GSTs family play an important role in the cell detoxification from xenobiotics that may be carcinogenic (Seidegård and Ekström, 1997) and *GSTP1* expression level deregulation has already been associated to prostate, breast, liver, renal, and endometrial carcinomas (Yuan et al., 2008) and to MCLs (Bennaceur-Griscelli et al., 2004; Bosch et al., 1994).

According with other findings, also genes located on chromosomes other than the 11 were found deregulated as *TP53*, *SOX11*, *BCL* family members and *RB1* (Kienle et al., 2007; Meggendorfer et al., 2013; Rummel et al., 2004; Sakhdari et al., 2019)

The obtained results were also confirmed by data mining of transcriptomic data from Gene Expression Omnibus (GEO) of 15 conventional MCL patients' samples composed of Peripheral blood CD19+ tumor cells (GSE16455) and of 3 naive B-cells samples (GSE12366). We have found that the expression of genes located in two short regions (4 Mb) on chromosomes 7 and 9 and one long region (15 Mb) on the chromosome 11 in proximity of the translocation breakpoint, mainly located on the der11 were significantly deregulated. This event was specifically occurring in MCL after the t(11;14), indeed performing the same analysis on data obtained from Follicular Lymphoma cells, the expression of the genes located in the same regions was not significantly changed.

For *CCND1* overexpression mechanisms in MCL, different hypothesis have been formulated (Allinne et al., 2014; Liu et al., 2008). It is assumed that it depends on the potent E μ enhancer located upstream of *CCND1* in the *IGH* locus even if the distance between the two partners could be several hundred kilobases (Degan et al., 2002; Greisman et al., 2012). Our laboratory previously proposed that the *CCND1* transcriptional activation in MCL was related to the repositioning of the rearranged *IGH-CCND1*-carrying chromosome (der14) in close proximity with the nucleolus, a nuclear territory with abundant nucleolin acting as transcriptional factor and PolII molecules.

Translocations can lead to large scale modification of chromosome territory position affecting the expression of many different genes (Harewood et al., 2010).

Analysis of the nuclear positioning and transcriptional modifications of the der11, one of the chromosomes generated by the translocation t(11;14), carrying a large portion of the chromosome 11 (~71Mb) and a small part of chromosome 14 (~10 Mb), revealed that

surprisingly the presence on this chromosome of a small fragment of the chromosome 14 is enough to induce a large movement of a large portion of the chromosome 11 in the nuclear space. We observed that the der11 relocates in close proximity to the nucleolus where the nucleolin, component of the LR1 transcription factor, can directly bind chromatin and lead to the deregulation of gene expression. We found the same transcriptional deregulation and nuclear remodelling in four MCL patients in leukemic phase.

In summary, in the present and previous works from our laboratory, we provided novel proofs of genes as possible markers for MCL other than *CCND1* and describe large scale chromatin modification leading to a nucleolin dependent massive gene deregulation in specific regions of der14 and der11 chromosomes.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants from the ANRS, INSERM (ENVIBURKITT) and La Ligue Contre le Cancer (M27231). We gratefully acknowledge the imaging and cytometry platform of the Gustave Roussy Institute for the technical support.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures

The human Mantle cell lymphoma (MCL) cell line GRANTA-519 was kept in culture in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS 2 mM L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA). For cultivating the lymphoblastoid cell line (LCL) RPMI8866 this medium was further supplemented with 2% Glucose, and 1mM Sodium pyruvate (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA).

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from blood of MCL patients by Pancoll (PAN biotech, Aidenbach, Germany, lymphocytes separation medium) density gradient centrifugation. B lymphocytes were obtained by negative cell selection using the MagniSort Human B-cell enrichment kit II (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. They were kept in culture for 24h into RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and 1% penicillin/streptomycin antibiotics (Gibco®, Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) before collecting them for further analysis.

Human Embryonic Kidney (HEK-293) cells were cultivated in DMEM (Gibco®, Thermo Scientific, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% FBS, 2mM glutamine and 1% penicillin/streptomycin.

All cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere.

Mantle cell lymphoma patients

Whole blood samples were obtained from four individuals followed in the Department of Medical Oncology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France. Blood samples were collected in agreement with French law and informed consent was obtained from all subjects.

RNA isolation, library preparation and RNA sequencing

RNA was extracted from LCL RPMI8866, GRANTA-519 and B-cells purified from four MCL patients using the NucleoSpin® RNA II kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel, Oensingen, Switzerland). A minimum of 2µg per samples were used for analysis. Samples were processed and analyzed at NovoGene Co., Beijing, China. Quality and quantity were assessed with Qubit Fluorometer, poly-A enriched library prepared, samples sequenced using an Illumina PE150 and analyzed.

Replication timing analysis

LCL RPMI8866 and GRANTA-519 were pulse labeled with BrdU and sorted into two S-Phase fractions (early and late S-Phase). BrdU labeled nascent DNA from early and late fractions were immunoprecipitated with an anti-BrdU antibody, amplified, differentially labeled, and co-hybridized onto a whole human genome oligonucleotide microarray. The log₂-ratio of the abundance of each genomic probe in the early and late S-phase fractions generates a replication-timing profile that reveals early and late replicated domains.

Replication timing analysis was carried out as previously described (Hassan-Zadeh et al., 2012). Briefly, immunoprecipitated nascent strands were amplified by whole-genome amplification kit (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA). After amplification, early and late nascent strands were labeled with Cy3 and Cy5 ULS molecules using the Genomic DNA labeling Kit (Agilent, Santa Clara, CA, USA) following manufacturer's instructions. The hybridization was performed according to the manufacturer instructions on human CGH microarrays that cover the whole genome. Microarrays were scanned with an Agilent's High-Resolution C Scanner using a resolution of 2 µm and the autofocus option. Feature extraction was done with Feature Extraction 9.1 software (Agilent, Santa Clara, CA, USA). For each experiment, the raw data sets were automatically normalized by the Feature extraction software. Analysis was performed with Agilent Genomic Workbench 5.0 software. The log₂-ratio timing profiles were smoothed using the Moving Average option of the Agilent Genomic Workbench 5.0 software with the linear algorithm and 200 kb windows.

Immuno-3D-FISH

“RainbowFISH” probes (Empire Genomics, Buffalo, NY, USA)) used for hybridization and staining of human chromosome loci 14q32.33 (*IGH* gene locus) and 11q13.2 (*GSTP1* gene locus) were labeled with SpectrumOrange and SpectrumGreen respectively. Cells were immunofluorescently stained with the rabbit anti-nucleolin antibody (Sigma-Aldrich). Nuclei were stained with DAPI diluted into the Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Immuno-3D-FISH was performed as previously described (Germini et al., 2017).

Microscope image acquisition and analysis

Images were acquired using a TCS SP8 confocal microscope (Leica Microsystems, Berlin, Germany) with a 63X oil immersion objective. Z-stacks were acquired using a frame size of

1024×1024, and 0.5 µm z-steps, with sequential multitrack scanning using the 405, 488, 543, 633 nm laser wavelengths for detecting DAPI (cell nuclei), SpectrumGreen (*GSTP1*), SpectrumOrange (*IGH*) and far-red (Nucleolin). Radial position and distance from the closest nucleolus of gene loci was calculated using the Bitplane® Imaris (Zurich, Switzerland) program.

HEK cells transfection and sorting

400,000 cells were plated in 6-well plate in complete DMEM medium. The day after when cells reached approximately 70% of confluence they were transfected with 3µg of the PEGFPC1 plasmid (Addgene #28176) using the Viafect reagent (Promega, Madison, WI, USA) following manufacturer's protocol. Transfection was carried out for 48h and then GFP+ cells sorted using the ARIA III cell sorter (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

RT-qPCR

Total RNA was extracted from cells using the NucleoSpin® RNA II kit according to the manufacturer's protocol (Macherey-Nagel). Sixty nanograms of total RNA were reverse transcribed by using the RevertAid H Minus First Strands cDNA Synthesis Kit with oligo(dT) primers (Thermo Scientific). The obtained cDNA was amplified using specific primers (**Supplementary Table 1**) and the PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Scientific). Expression of target genes was analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method with normalization with *GAPDH* and comparison of expression between non transfected (Control) and GFP+ cells. For quantification, expression levels were set to 1 in control.

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)-seq

Thirty millions cells were fixed with 1% formamide for 1 minute in a rotating wheel. Fixation reaction was stopped by adding 0.125M glycine. Cells were then pelleted at 4°, 1400xg for 10 minutes and washed 3 times in ice cold 1XPBS. At the third wash, 0.5%PIC and 0.5mM of PMSF were added. Cells were pelleted and resuspended in 1 mL of lysis buffer (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 0.5mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.5% PIC, 0.5mM PMSF, water). Cell lysate was transferred to a dounce homogenizer to allow the separation between cell cytoplasm and nuclei and dounced 10 times. Nuclei are then pelleted by centrifugation at 5000xg for 5 minutes at 4° and resuspended in nuclear lysis buffer (50mM Tris-HCl, 10mM EDTA, 1% SDS, 1% PIC, 1mM PMSF, water). Nuclei were sonicated in ice in a Vibra Cell sonicator (Newtown, CT, USA) with 25 cycles of 30 sec pulse-on, 30 sec pulse-off, 75%

amplitude. The non-solubilized material was removed by centrifugation at 15,000g for 10 min. The desired size of chromatin fragments (100-500 bp) was monitored by electrophoresis in a 1% agarose gel after reverse crosslinking (dilution 1:4 in water and adding 0.250M of NaCl keeping at 65° overnight in a thermalcycler), treatment with 100µg/ml RNase A (37° for 15 minutes) and 50µg/ml proteinase K and purification using the PCR cleanup kit (Macherey-Nagel).

Chromatin immunoprecipitation was performed as following: 25 µg of chromatin solution was incubated at 4° overnight with 25µl of the PrG-Dynabeads (Thermo Scientific), 3µg of antibody (rabbit-anti Nucleolin, Sigma-Aldrich), ChIP Buffer I (Active Motif, La Hulpe, Belgium), 1X PIC and water. The following day the beads were washed once with ChIP Buffer I and twice with ChIP Buffer II (Active Motif) before elution with 50mM Glycine (pH 2.8) for 15 minutes at room temperature. Elution was stopped by adding Tris base 1M (pH10.4). By using a magnet, supernatant was kept, reverse cross-linked, purified and quantified by using a Nanodrop (Thermo Scientific).

Before sequencing, effective ChIP was checked via PCR amplification of known positive and negative targets of the nucleolin by normalizing the results using the input sample.

A minimum of 100ng of ChIP DNA were sent to NovoGene for sequencing where quality and quantity were assessed with Qubit Fluorometer, library prepared, samples sequenced using an Illumina PE150 and analyzed.

Statistical analyses

The Student t-test was used to compare means. All tests were performed using the GraphPad Prism 5 software (GraphPad software Inc., La Jolla, CA, USA).

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Gene transcription and replication timing is perturbed on the chromosome 11 after the t(11;14) translocation.

(A) Profile of gene transcription upregulation along chromosome 11 in GRANTA-519 cells compared to LCL RPMI8866. RNA was extracted from GRANTA-519 cells and LCL RPMI 8866, used as a control, and RNA seq performed. Upregulated genes were mapped along the chromosome 11, on the Y axis log2 fold change (FC) of each gene is reported from the first upregulated gene ("1" on the X axis) on the p arm of the chromosome 11 to the last one on the telomeric region. Log2FC of the genes located upstream (on the der11 after the t(11;14)) and downstream (on the der14 after the t(11;14)) of the *CCND1* are represented in green and red, respectively.

(B) Percentage of deregulated genes in seven non overlapping 15mb regions of the chromosome 11. The percentage was calculated on the total number of upregulated genes of the chromosome 11. Genes located upstream (on the der11 after the t(11;14)) and downstream (on the der14 after the t(11;14)) of the *CCND1* are represented in green and red, respectively. The red and green histograms represent the percentage of upregulated genes in the 15mb surrounding the *CCND1*.

(C) Replication timing profiles at the region surrounding the translocation breakpoint on the chromosome 11. The profiles are represented with two light blue lines for LCL RPMI8866 and two violet lines for MCL cells GRANTA-519. Cells were sorted into two fractions of S-Phase (early and late S-Phase). Pulse labeled BrdU nascent DNA from each fraction was recovered by immunoprecipitation and differentially labeled before co-hybridization to a human genome CGH microarray, containing one 60-mer oligonucleotide probe every 13 Kb. The log2-ratio (early/late) of the abundance of each probe in the early and late S-phase is shown. The timing profiles were smoothed using the Moving Average option of the Agilent Genomic Workbench 6.5 software with the triangular algorithm and 500 kb windows. Fast replicating genes are represented in red while in green the slow replicating ones. The black arrow highlight region where the replication timing shift is more evident.

Figure 2. RNA-seq in GRNATA-519 cells and in B-cells from MCL patients reveals commonly upregulated genes. RNA-seq was performed on RNA extracted from GRANTA-519 cells, B-cells purified from MCL patients and LCL RPMI8866. All the transcriptomes were compared with the transcriptome of LCL RPMI8866. Upregulated genes from all comparisons were mapped on the different chromosomes. Upregulated genes located on the

chromosome 11 are represented. The overlapping area among GRANTA-519 and the four MCL patients represents the commonly upregulated gene (n=88). At the bottom is schematically represented where these genes are distributed along the chromosome 11. The two black lines delimit the 15mb region surrounding the translocation breakpoint (represented by a red line). All RNA-seq were performed in triplicates.

Figure 3. After the t(11;14), translocated alleles move in the nuclear space in close proximity with the nucleolus.

(A) Radial distribution of the terminal part of the *IGH* gene locus (chromosome 14) and of the *GSTP1* locus (chromosome 11) in nuclei from MCL cells GRANTA-519 (where at least one allele of these loci is translocated in the t(11;14)) and LCL RPMI8866 where they do not translocate. X axis, distribution of fluorescent foci in 10 nuclear fractions of equal volume from the periphery (“1”, left) to the center (“10”, right) of the nucleus; Y-axis, percentage of fluorescent foci in corresponding fraction. The radial position of *IGH* and *GSTP1* loci is schematically represented in the two pictures on the right. The triangle represents a portion of the nucleus divided into 10 equal volumes. The red (*IGH*) and green (*GSTP1*) dots are placed in the nuclear fractions where the highest amount of signals was found. (B) Percentage of signals whose distance to the nucleolus is lower or equal to 1µm. Results are represented as means ± SEM. ***: p<0.001. A minimum of 216 loci were analyzed. (C) Representative 3D-FISH images showing non translocated (LCL RPMI8866, top panels) and colocalized/translocated (GRANTA-519, bottom panels) *IGH* (red) and *GSTP1* (green) gene loci in cell nuclei. Red and green colocalized signals determined the translocated alleles (der11). The square in the lower merge panel points to colocalized alleles. Nucleolus is visualized by nucleolin staining and represented in blue. Scale bar, 5 µm.

Figure 4. Der11 chromosome is closer to the nucleolus in MCL patients. (A) The percentage of translocated (Der11, grey histograms) and non-translocated *GSTP1* loci (Chr11, white histograms) closer than 1µm to nucleolus was calculated in B-cells purified from four MCL patients. *: p<0.05. (B) Means of these percentages were compared using the t-test. *: P<0.001.

Figure 5. Nucleolin binds in proximity of transcriptional deregulated genes. Integrated Genome Viewer visualization of nucleolin peaks are shown in GRANTA-519(upper lane) or LCL RPMI8866 (lower lane). ChIP-seq experiment was performed in duplicate. The

nucleolin profiles of the *CD6* and of the *CPT1A* locus are shown. The red lines are drawn in correspondence of the gene locus position on the chromosome 11 and the red arrows highlights the peaks observed in GRANTA-519 and not in LCL RPMI8866.

Figure 6. Ectopic expression of nucleolin induces overexpression of genes located close to the translocation breakpoint. Analysis of *Nucleolin* (A), *CD6*, *AHNAK*, *RASGRP2*, *PYGM*, *CTSF*, *CPT1A*, *DAK*, *RTN3*, *SOD1* and *RUNX1T1* (B) transcription in HEK cells transfected with a nucleolin encoding plasmid (grey histograms) or non-transfected (controls, white histograms). The transcription of the target genes was measured by qRT-PCR. Fold change expressions are in comparison with controls and after normalization vs. *GAPDH*. *CD6*, *AHNAK*, *RASGRP2*, *PYGM*, *CTSF*, *CPT1A* are located on the chromosome 11 and upregulated in the RNA-seq analysis, *DAK*, *RTN3*, *SOD1* and *RUNX1T1* served as controls as they were not deregulated in the RNA-seq analysis and are located on chromosomes 11 (*DAK*, *RTN3*), 21 (*SOD1*) and 8 (*RUNX1T1*). Data are means $\pm$ SEM. ***: $p < 0.001$; **: $p < 0.01$; *: $p < 0.05$.

REFERENCES

- Ahmed, M., Zhang, L., Nomie, K., Lam, L., and Wang, M. (2016). Gene mutations and actionable genetic lesions in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 7, 58638–58648.
- Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klibi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Markozashvili, D., Petrova, N., Camara-Clayette, V., Ioudinkova, E., et al. (2014). Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood* 123, 2044–2053.
- Aplan, P.D. (2006). Causes of oncogenic chromosomal translocation. *Trends Genet.* 22, 46–55.
- Bailey, T.L., and Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 2, 28–36.
- Bassi, C., Li, Y.T., Khu, K., Mateo, F., Baniyadi, P.S., Elia, A., Mason, J., Stambolic, V., Pujana, M.A., Mak, T.W., et al. (2016). The acetyltransferase Tip60 contributes to mammary tumorigenesis by modulating DNA repair. *Cell Death Differ.* 23, 1198–1208.
- Bennaceur-Griscelli, A., Bosq, J., Koscielny, S., Lefrère, F., Turhan, A., Brousse, N., Hermine, O., and Ribrag, V. (2004). High Level of Glutathione-S-Transferase π Expression in Mantle Cell Lymphomas. *Clin. Cancer Res.*
- Bentz, M., Plesch, A., Bullinger, L., Stilgenbauer, S., Ott, G., Müller-Hermelink, H.K., Baudis, M., Barth, T.F.E., Möller, P., Lichter, P., et al. (2000). t(11;14)-positive mantle cell lymphomas exhibit complex karyotypes and share similarities with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosom. Cancer.*
- Bosch, F., Jares, P., Campo, E., Lopez-Guillermo, A., Piris, M.A., Villamor, N., Tassies, D., Jaffe, E.S., Montserrat, E., Rozman, C., et al. (1994). PRAD-1/cyclin D1 gene overexpression in chronic lymphoproliferative disorders: A highly specific marker of mantle cell lymphoma. *Blood.*
- Camara-Clayette, V., Hermine, O., and Ribrag, V. (2012). Emerging agents for the treatment of mantle cell lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 12, 1205–1215.
- Campo, E., and Rule, S. (2015). Mantle cell lymphoma: Evolving management strategies. *Blood* 125, 48–55.
- Covington, K.R., and Fuqua, S.A.W. (2014). Role of MTA2 in human cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 33, 921–928.
- Degan, M., Doliana, R., Gloghini, A., Di Francia, R., Aldinucci, D., Mazzocut-Zecchin, L., Colombatti, A., Attadia, V., Carbone, A., and Gattei, V. (2002). A novel bcl-1/JH breakpoint from a patient affected by mantle cell lymphoma extends the major translocation cluster. *J. Pathol.* 197, 256–263.
- Dreyling, M.H., Bullinger, L., Ott, G., Stilgenbauer, S., Müller-Hermelink, H.K., Bentz, M., Hiddemann, W.,

and Döhner, H. (1997). Alterations of the cyclin D1/p16-pRB pathway in mantle cell lymphoma. *Cancer Res.* 57, 4608–4614.

Epperla, N., Hamadani, M., Fenske, T.S., and Costa, L.J. (2017). Incidence and survival trends in mantle cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* 2006–2008.

Fiancette, R., Amin, R., Truffinet, V., Vincent-Fabert, C., Cogné, N., Cogné, M., and Denizot, Y. (2010). A myeloma translocation-like model associating CCND1 with the immunoglobulin heavy-chain locus 3' enhancers does not promote by itself B-cell malignancies. *Leuk. Res.*

Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O. V., Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., et al. (2017). HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia* 31, 2515–2522.

Greisman, H.A., Lu, Z., Tsai, A.G., Greiner, T.C., Yi, H.S., and Lieber, M.R. (2012). IgH partner breakpoint sequences provide evidence that AID initiates t(11;14) and t(8;14) chromosomal breaks in mantle cell and Burkitt lymphomas. *Blood* 120, 2864–2867.

Grumolato, L., and Aaronson, S.A. (2014). Oncogenes and Signal Transduction. In *The Molecular Basis of Cancer: Fourth Edition*

Hanakahi, L. a, Dempsey, L. a, Li, M.J., and Maizels, N. (1997). Nucleolin is one component of the B cell-specific transcription factor and switch region binding protein, LR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3605–3610.

Harewood, L., and Fraser, P. (2014). The impact of chromosomal rearrangements on regulation of gene expression. *Hum. Mol. Genet.* 23.

Harewood, L., Schutz, F., Boyle, S., Perry, P., Delorenzi, M., Bickmore, W.A., and Reymond, A. (2010). The effect of translocation-induced nuclear reorganization on gene expression. *Genome Res* 20, 554–564.

Hartmann, E., Fernández, V., Moreno, V., Valls, J., Hernández, L., Bosch, F., Abrisqueta, P., Klapper, W., Dreyling, M., Hoster, E., et al. (2008). Five-gene model to predict survival in mantle-cell lymphoma using frozen or formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *J. Clin. Oncol.* 26, 4966–4972.

Hassan-Zadeh, V., Chilaka, S., Cadoret, J.C., Ma, M.K.W., Boggetto, N., West, A.G., and Prioleau, M.N. (2012). USF binding sequences from the HS4 insulator element impose early replication timing on a vertebrate replicator. *PLoS Biol.* 10.

Hirt, C., Schüler, F., Dölken, L., Schmidt, C.A., and Dölken, G. (2004). Low prevalence of circulating

t(11;14)(q13;q32)-positive cells in the peripheral blood of healthy individuals as detected by real-time quantitative PCR. *Blood*.

Hoster, E., Dreyling, M., Klapper, W., Gisselbrecht, C., Van Hoof, A., Kluin-Nelemans, H.C., Pfreundschuh, M., Reiser, M., Metzner, B., Einsele, H., et al. (2008). A new prognostic index (MIPI) for patients with advanced-stage mantle cell lymphoma. *Blood* 111, 558–565.

Jares, P., Colomer, D., and Campo, E. (2012). Molecular pathogenesis of mantle cell lymphoma. *J. Clin. Invest.* 122, 3416–3423.

Ji, C., Zhao, Y., Kou, Y.-W., Shao, H., Guo, L., Bao, C.-H., Jiang, B.-C., Chen, X.-Y., Dai, J.-W., Tong, Y.-X., et al. (2017). Cathepsin F Knockdown Induces Proliferation and Inhibits Apoptosis in Gastric Cancer Cells. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 26, 83–93.

Kienle, D., Katzenberger, T., Ott, G., Saupé, D., Benner, A., Kohlhammer, H., Barth, T.F.E., Höller, S., Kalla, J., Rosenwald, A., et al. (2007). Quantitative gene expression deregulation in mantle-cell lymphoma: Correlation with clinical and biologic factors. *J. Clin. Oncol.* 25, 2770–2777.

Knackmuss, U., Lindner, S.E., Aneichyk, T., Kotkamp, B., Knust, Z., Villunger, A., and Herzog, S. (2016). MAP3K11 is a tumor suppressor targeted by the oncomiR miR-125b in early B cells. *Cell Death Differ.* 23, 242–252.

Lee, J.W., Soung, Y.H., Kim, S.Y., Nam, S.W., Kim, C.J., Cho, Y.G., Lee, J.H., Kim, H.S., Park, W.S., Kim, S.H., et al. (2004). Inactivating mutations of proapoptotic Bad gene in human colon cancers. *Carcinogenesis* 25, 1371–1376.

Li, J.Y., Gaillard, F., Moreau, A., Harousseau, J.L., Labois, C., Milpied, N., Bataille, R., and Avet-Loiseau, H. (1999). Detection of translocation t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma by fluorescence in situ hybridization. *Am. J. Pathol.*

Lieber, M.R. (2016). Mechanisms of human lymphoid chromosomal translocations. *Nat. Rev. Cancer* 16, 387–398.

Liu, H., Huang, J., Wang, J., Jiang, S., Bailey, A.S., Goldman, D.C., Welcker, M., Bedell, V., Slovak, M.L., Clurman, B., et al. (2008). Transvection mediated by the translocated cyclin D1 locus in mantle cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 205, 1843–1858.

Lovec, H., Grzeschiczek, A., Kowalski, M.B., and Mörröy, T. (1994). Cyclin D1/bcl-1 cooperates with myc genes in the generation of B-cell lymphoma in transgenic mice. *EMBO J.*

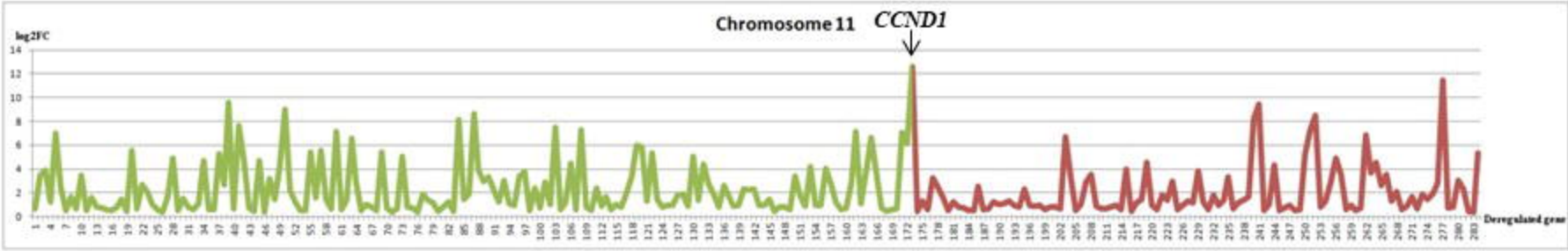
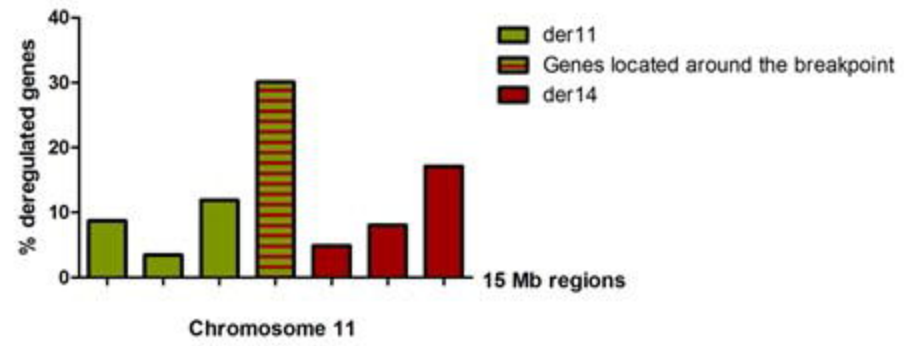
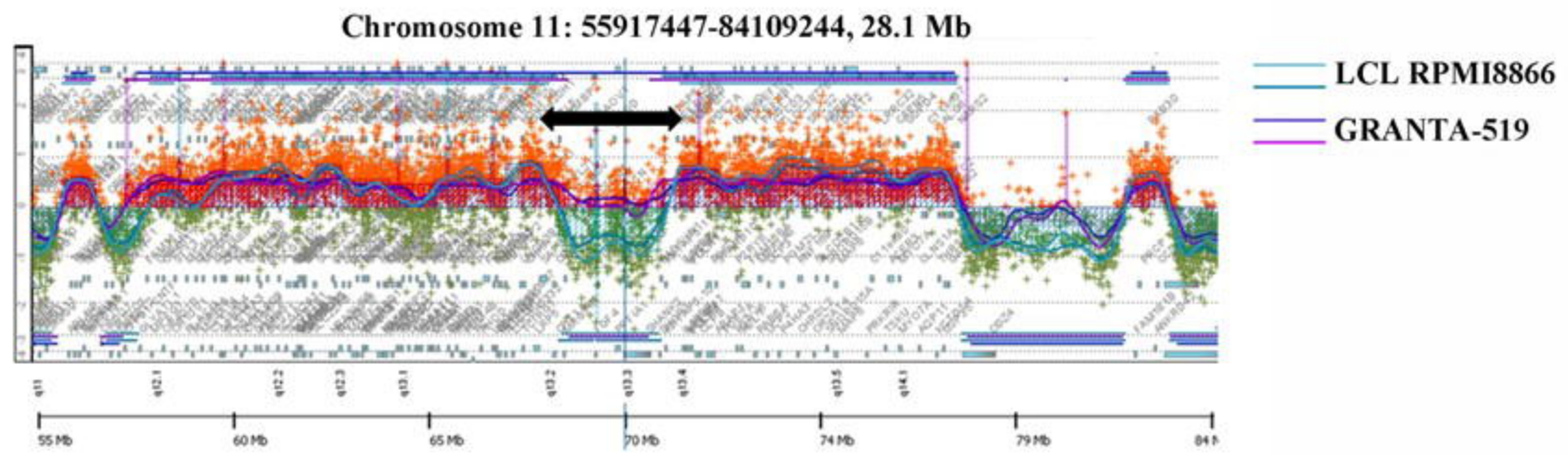
- Meggendorfer, M., Kern, W., Haferlach, C., Haferlach, T., and Schnittger, S. (2013). SOX11 overexpression is a specific marker for mantle cell lymphoma and correlates with t(11;14) translocation, CCND1 expression and an adverse prognosis. *Leukemia* 27, 2388–2391.
- Melone, M.A.B., Valentino, A., Margarucci, S., Galderisi, U., Giordano, A., and Peluso, G. (2018). The carnitine system and cancer metabolic plasticity review-article. *Cell Death Dis.* 9.
- Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 43, 830–837.
- Peterson, J.F., Baughn, L.B., Ketterling, R.P., Pitel, B.A., Smoley, S.A., Vasmataz, G., Smadbeck, J.B., Greipp, P.T., Mangaonkar, A.A., Thompson, C.A., et al. (2019). Characterization of a cryptic IGH/CCND1 rearrangement in a case of mantle cell lymphoma with negative CCND1 FISH studies. *Blood Adv.* 3, 1298–1302.
- Razin, S. V., Gavrilov, A.A., Pichugin, A., Lipinski, M., Iarovaia, O. V., and Vassetzky, Y.S. (2011). Transcription factories in the context of the nuclear and genome organization. *Nucleic Acids Res.* 39, 9085–9092.
- Rhind, N., and Gilbert, D.M. (2013). DNA Replication Timing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, 1–26.
- Rivera-Mulia, J.C., Buckley, Q., Sasaki, T., Zimmerman, J., Didier, R.A., Nator, K., Loring, J.F., Lian, Z., Weissman, S., Robins, A.J., et al. (2015). Dynamic changes in replication timing and gene expression during lineage specification of human pluripotent stem cells. *Genome Res.* 25, 1091–1103.
- Rizzatti, E.G., Falcão, R.P., Panepucci, R.A., Proto-Siqueira, R., Anselmo-Lima, W.T., Okamoto, O.K., and Zago, M.A. (2005). Gene expression profiling of mantle cell lymphoma cells reveals aberrant expression of genes from the PI3K-AKT, WNT and TGFβ signalling pathways. *Br. J. Haematol.* 130, 516–526.
- Rummel, M.J., De Vos, S., Hoelzer, D., Koeffler, H.P., and Hofmann, W.K. (2004). Altered apoptosis pathways in mantle cell lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 45, 49–54.
- Sakhdari, A., Ok, C.Y., Patel, K.P., Kanagal-Shamanna, R., Yin, C.C., Zuo, Z., Hu, S., Routbort, M.J., Luthra, R., Medeiros, L.J., et al. (2019). TP53 mutations are common in mantle cell lymphoma, including the indolent leukemic non-nodal variant. *Ann. Diagn. Pathol.* 41, 38–42.
- Seidegård, J., and Ekström, G. (1997). The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. In *Environmental Health Perspectives*, pp. 791–799.

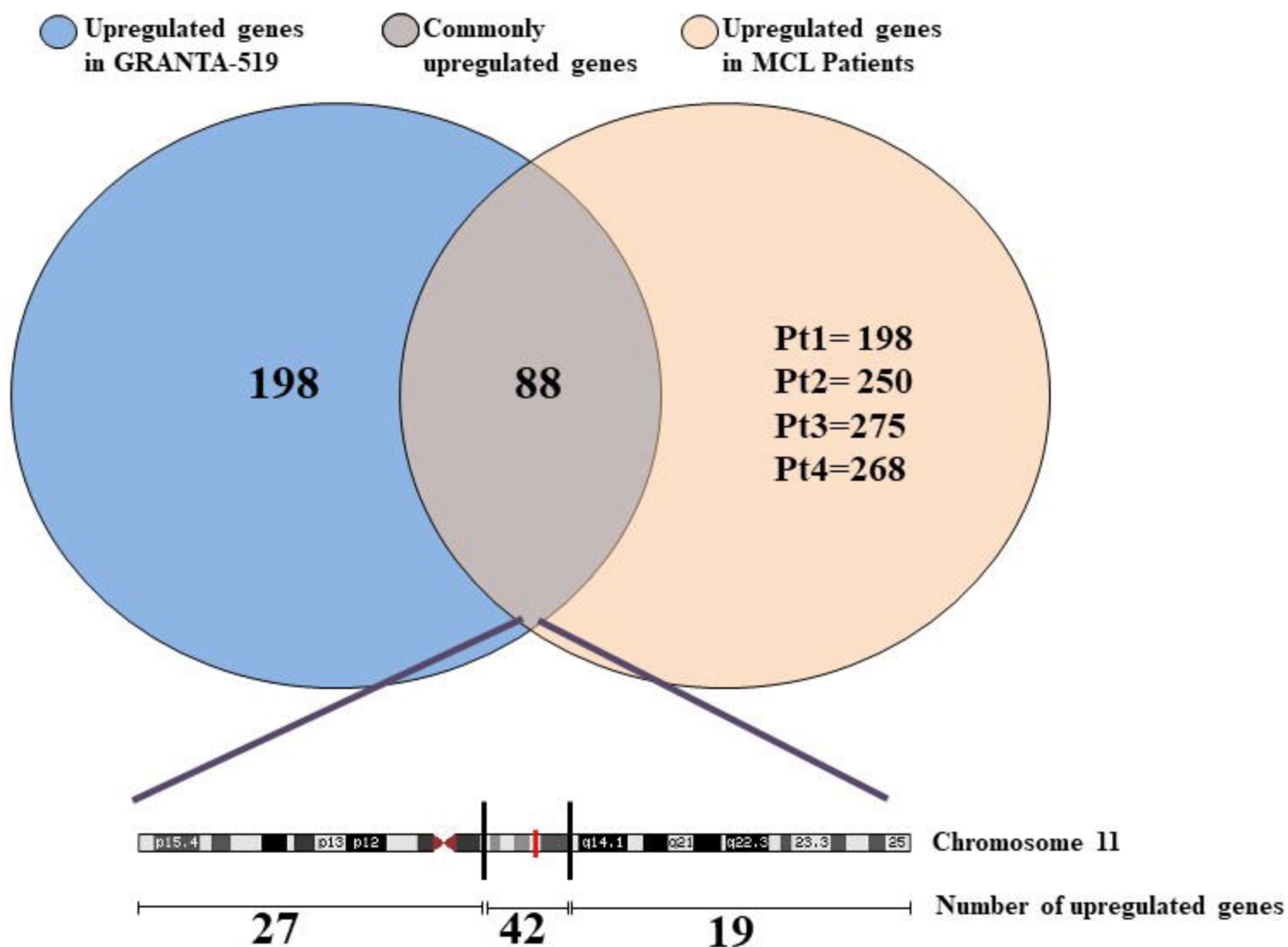
Skarbnik, A.P., and Goy, A.H. (2015). Mantle cell lymphoma: state of the art. *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* *13*, 44–55.

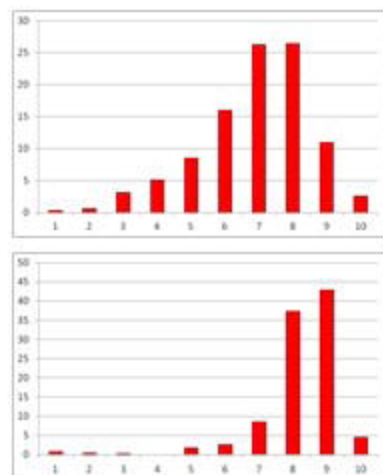
Thieblemont, C., Pack, S., Sakai, A., Beaty, M., Pak, E., Vortmeyer, A.O., Wellmann, A., Zhuang, Z., Jaffe, E.S., and Raffeld, M. (1999). Allelic loss of 11q13 as detected by MEN1-FISH is not associated with mutation of the MEN1 gene in lymphoid neoplasms. *Leukemia* *13*, 85–91.

Vose, J.M. (2017). Mantle cell lymphoma: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and clinical management. *Am. J. Hematol.* *92*, 806–813.

Yuan, Y., Qian, Z.R., Sano, T., Asa, S.L., Yamada, S., Kagawa, N., and Kudo, E. (2008). Reduction of GSTP1 expression by DNA methylation correlates with clinicopathological features in pituitary adenomas. *Mod. Pathol.* *21*, 856–865.

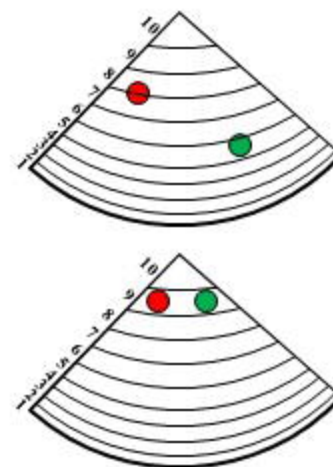
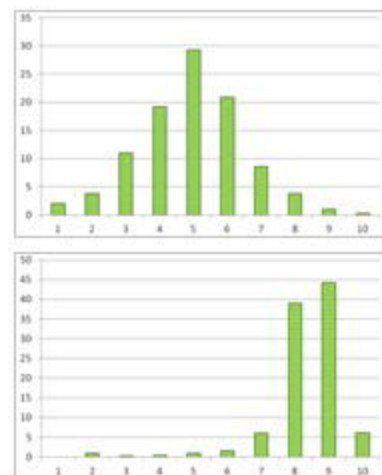
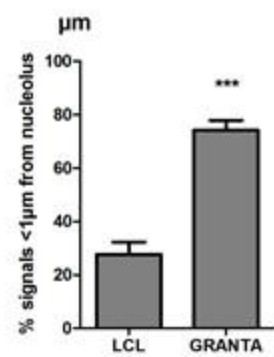
A**B****C**



ATel14 *IGH*

LCL RPMI8866

Granta 519

GSTP1**B**

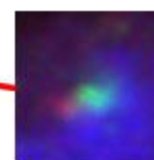
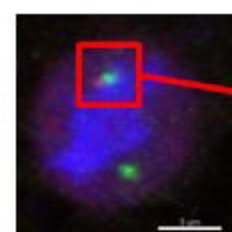
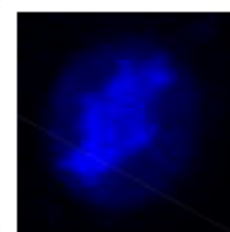
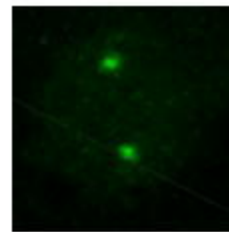
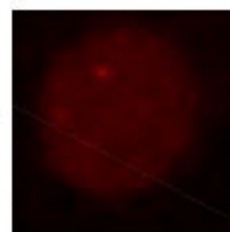
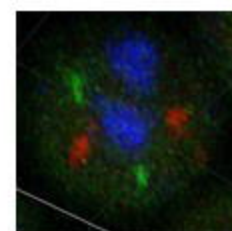
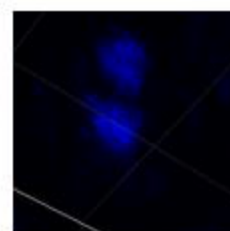
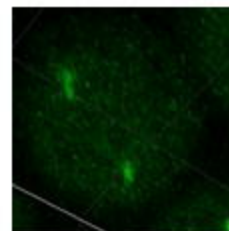
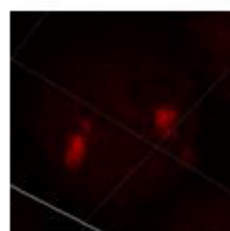
LCL RPMI 8866

GRANTA 519

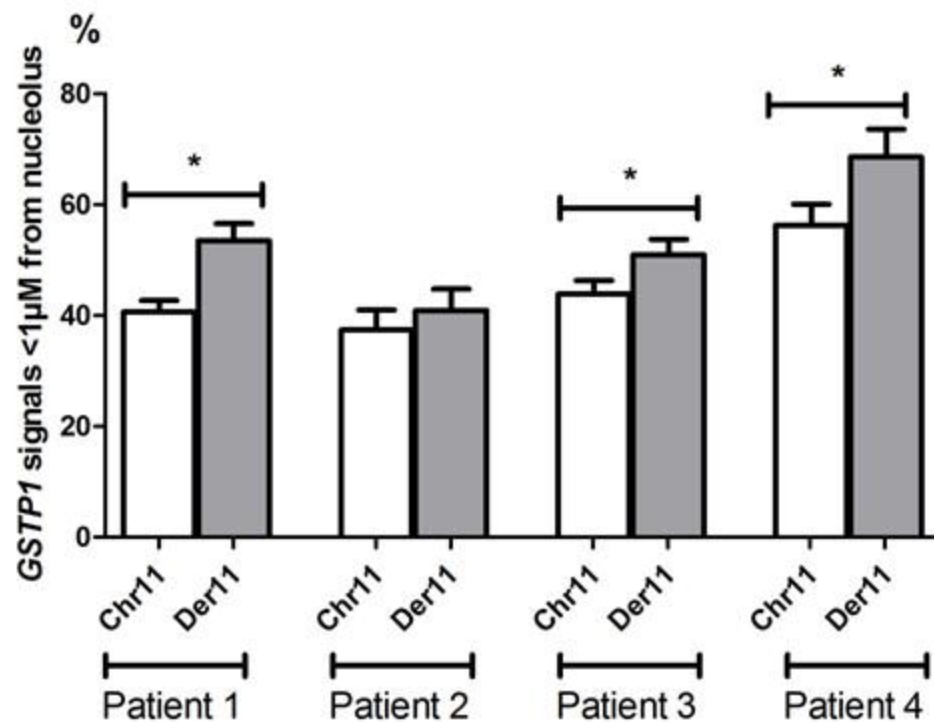
CTel14 (*IGH*)*GSTP1*

Nucleolin

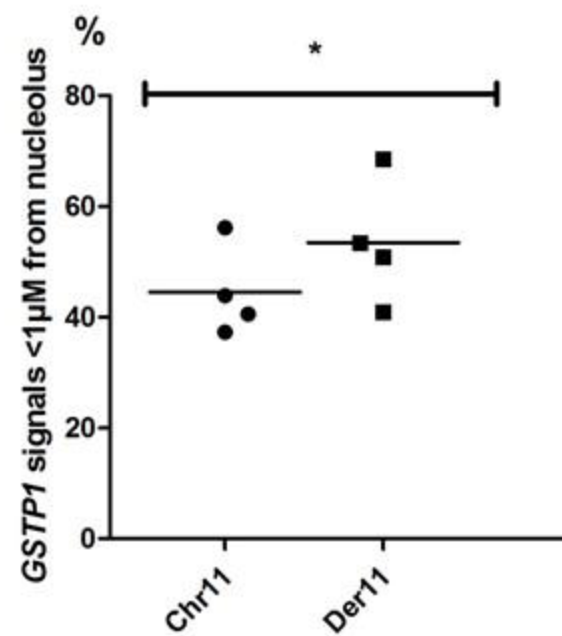
Merge



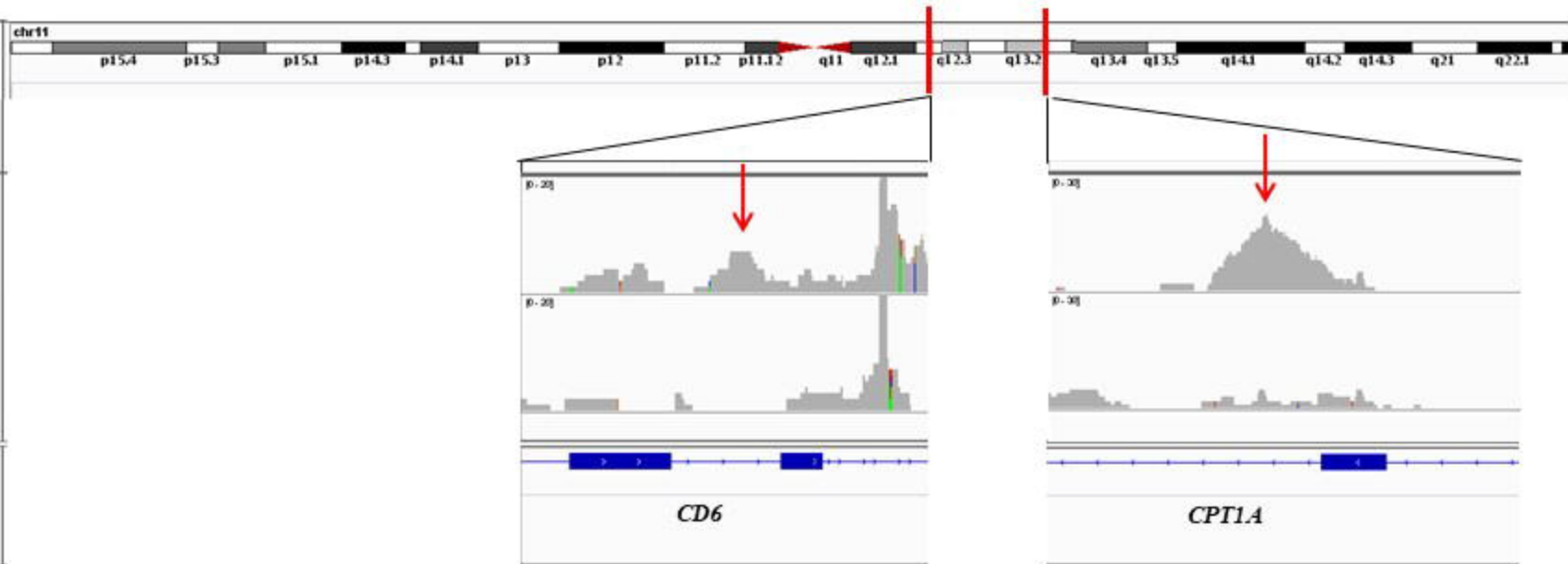
A



B

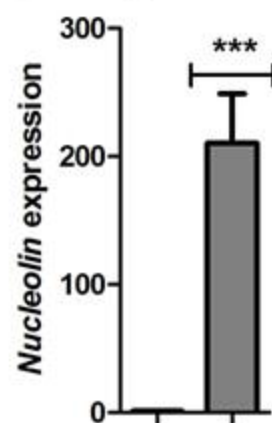


GRANTAaIP.bam Coverage
LCLaIP.bam Coverage
Gene



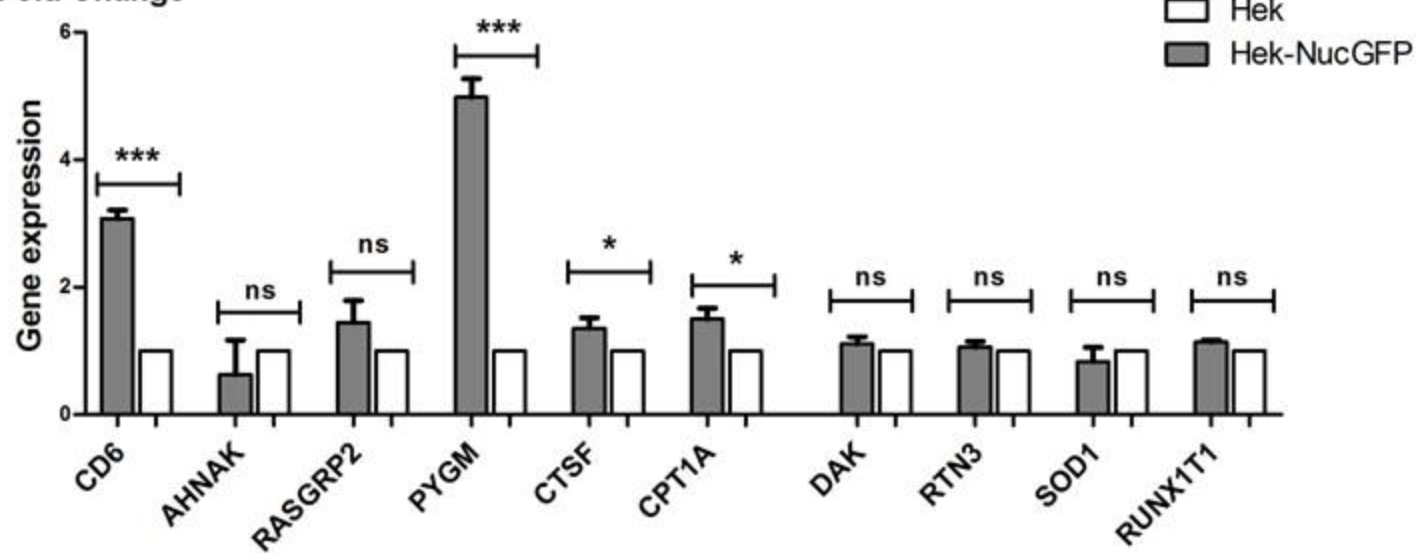
A

Fold Change



B

Fold Change



Références Bibliographiques

- Abdel-Hamid, M., Chen, J.J., Constantine, N., Massoud, M., and Raab-Traub, N. (1992). EBV strain variation: geographical distribution and relation to disease state. *Virology* *190*, 168–175.
- Accardi, R., Fathallah, I., Gruffat, H., Mariggio, G., Le Calvez-Kelm, F., Voegele, C., Bartosch, B., Hernandez-Vargas, H., McKay, J., Sylla, B.S., et al. (2013). Epstein - Barr virus transforming protein LMP-1 alters B cells gene expression by promoting accumulation of the oncoprotein Δ Np73 α . *PLoS Pathog* *9*, e1003186.
- Accardi, R., Gruffat, H., Sirand, C., Fusil, F., Gheit, T., Hernandez-Vargas, H., Le Calvez-Kelm, F., Traverse-Glehen, A., Cosset, F.-L., Manet, E., et al. (2015). The mycotoxin aflatoxin B1 stimulates Epstein-Barr virus-induced B-cell transformation in in vitro and in vivo experimental models. *Carcinogenesis* *36*, 1440–1451.
- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D., and Brinster, R.L. (1985). The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancers induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature* *318*, 533–538.
- Adhikary, S., and Eilers, M. (2005). Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 635–645.
- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S.F., Katyal, S., Clements, P.M., McKinnon, P.J., Caldecott, K.W., and West, S.C. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* *443*, 713–716.
- Aitken, C., Sengupta, S.K., Aedes, C., Moss, D.J., and Sculley, T.B. (1994). Heterogeneity within the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 gene in different strains of Epstein-Barr virus. *J Gen Virol* *75* (Pt 1), 95–100.
- Ajasin, D., and Eugenin, E.A. (2020). HIV-1 Tat: Role in Bystander Toxicity. *Front Cell Infect Microbiol* *10*, 61.
- Aka, P., Vila, M.C., Jariwala, A., Nkrumah, F., Emmanuel, B., Yagi, M., Palacpac, N.M.Q., Periago, M.V., Neequaye, J., Kiruthu, C., et al. (2013). Endemic Burkitt lymphoma is associated with strength and diversity of *Plasmodium falciparum* malaria stage-specific antigen antibody response. *Blood* *122*, 629–635.
- Akbay, B., Germini, D., Bissenbaev, A.K., Musinova, Y.R., Sheval, E.V., Vassetzky, Y., and Dokudovskaya, S. (2021). HIV-1 Tat Activates Akt/mTORC1 Pathway and AICDA Expression by Downregulating Its Transcriptional Inhibitors in B Cells. *Int J Mol Sci* *22*.
- Al Tabaa, Y., Tuaillon, E., Bollere, K., Foulongne, V., Petitjean, G., Seigneurin, J.-M., Duperray, C., Desgranges, C., and Vendrell, J.-P. (2009). Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood* *113*, 604–611.
- Albanese, M., Tagawa, T., Bouvet, M., Maliqi, L., Lutter, D., Hoser, J., Hastreiter, M., Hayes, M., Sugden, B., Martin, L., et al. (2016). Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, E6467–E6475.
- Albini, A., Benelli, R., Giunciuglio, D., Cai, T., Mariani, G., Ferrini, S., and Noonan, D.M. (1998). Identification of a novel domain of HIV tat involved in monocyte chemotaxis. *J Biol Chem* *273*, 15895–15900.
- Aleksandrov, R., Hristova, R., Stoyanov, S., and Gospodinov, A. (2020). The Chromatin Response to Double-Strand DNA Breaks and Their Repair. *Cells* *9*, 1853.
- Allday, M.J. (2009). How does Epstein-Barr virus (EBV) complement the activation of Myc in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma? *Seminars in Cancer Biology* *19*, 366–376.
- Allinne, J., Pichugin, A., Iarovaia, O., Klibi, M., Barat, A., Zlotek-Zlotkiewicz, E., Markozashvili, D., Petrova, N., Camara-Clayette, V., Ioudinkova, E., et al. (2014). Perinucleolar relocalization and nucleolin as crucial events in the transcriptional activation of key genes in mantle cell lymphoma. *Blood* *123*, 2044–2053.
- Andersen, J.S., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Ong, S.-E., Lyon, C.E., Lamond, A.I., and Mann, M. (2005). Nucleolar proteome dynamics. *Nature* *433*, 77–83.
- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, R.E., and Allday, M.J. (2008). Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* *27*, 421–433.
- Aranda, S., Mas, G., and Di Croce, L. (2015). Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. *Sci. Adv.* *1*, e1500737.

- Arizala, J., and Rossi, J.J. (2011). Role of the Nucleolus in HIV Infection and Therapy. In *The Nucleolus*, M.O.J. Olson, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 381–402.
- Arizala, J.A.C., Takahashi, M., Burnett, J.C., Ouellet, D.L., Li, H., and Rossi, J.J. (2018). Nucleolar Localization of HIV-1 Rev Is Required, Yet Insufficient for Production of Infectious Viral Particles. *AIDS Research and Human Retroviruses* *34*, 961–981.
- Atallah-Yunes, S.A., Murphy, D.J., and Noy, A. (2020). HIV-associated Burkitt lymphoma. *Lancet Haematol* *7*, e594–e600.
- Aten, J.A., Stap, J., Krawczyk, P.M., van Oven, C.H., Hoebe, R.A., Essers, J., and Kanaar, R. (2004). Dynamics of DNA double-strand breaks revealed by clustering of damaged chromosome domains. *Science* *303*, 92–95.
- Aubry, V., Mure, F., Mariamé, B., Deschamps, T., Wyrwicz, L.S., Manet, E., and Gruffat, H. (2014). Epstein-Barr virus late gene transcription depends on the assembly of a virus-specific preinitiation complex. *J Virol* *88*, 12825–12838.
- Aya, T., Kinoshita, T., Imai, S., Koizumi, S., Mizuno, F., Osato, T., Satoh, C., Oikawa, T., Kuzumaki, N., and Ohigashi, H. (1991). Chromosome translocation and c-MYC activation by Epstein-Barr virus and Euphorbia tirucalli in B lymphocytes. *Lancet* *337*, 1190.
- Ayadi, W., Feki, L., Khabir, A., Boudawara, T., Ghorbel, A., Charfeddine, I., Daoud, J., Frikha, M., Hammami, A., and Karray-Hakim, H. (2007). Polymorphism analysis of Epstein-Barr virus isolates of nasopharyngeal carcinoma biopsies from Tunisian patients. *Virus Genes* *34*, 137–145.
- Aziz, K., Nowsheen, S., Pantelias, G., Iliakis, G., Gorgoulis, V.G., and Georgakilas, A.G. (2012). Targeting DNA damage and repair: Embracing the pharmacological era for successful cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* *133*, 334–350.
- Babcock, G.J., Decker, L.L., Volk, M., and Thorley-Lawson, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* *9*, 395–404.
- 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.
- Backhaus, O. (2018). Generation of Antibody Diversity. In *Antibody Engineering*, T. Böldicke, ed. (InTech), p.
- Baer, R., Bankier, A.T., Biggin, M.D., Deininger, P.L., Farrell, P.J., Gibson, T.J., Hatfull, G., Hudson, G.S., Satchwell, S.C., and Séguin, C. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* *310*, 207–211.
- Bagashev, A., and Sawaya, B.E. (2013). Roles and functions of HIV-1 Tat protein in the CNS: an overview. *Virol J* *10*, 358.
- Bahram, F., von der Lehr, N., Cetinkaya, C., and Larsson, L.G. (2000). c-Myc hot spot mutations in lymphomas result in inefficient ubiquitination and decreased proteasome-mediated turnover. *Blood* *95*, 2104–2110.
- Bahri, R. (2018). Séquençage du génome complet du virus d'Epstein-Barr dans des prélèvements issus de lymphomes T angio-immunoblastiques. Limoges.
- Banerjee, A.S., Pal, A.D., and Banerjee, S. (2013). Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* *443*, 294–305.
- Barillari, G., Gendelman, R., Gallo, R.C., and Ensoli, B. (1993). The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 7941–7945.
- Barillari, G., Sgadari, C., Palladino, C., Gendelman, R., Caputo, A., Morris, C.B., Nair, B.C., Markham, P., Nel, A., Stürzl, M., et al. (1999a). Inflammatory cytokines synergize with the HIV-1 Tat protein to promote angiogenesis and Kaposi's sarcoma via induction of basic fibroblast growth factor and the alpha v beta 3 integrin. *J Immunol* *163*, 1929–1935.
- Barillari, G., Sgadari, C., Fiorelli, V., Samaniego, F., Colombini, S., Manzari, V., Modesti, A., Nair, B.C., Cafaro, A., Stürzl, M., et al. (1999b). The Tat protein of human immunodeficiency virus type-1 promotes vascular cell growth and locomotion by engaging the alpha5beta1 and alphavbeta3 integrins and by mobilizing sequestered basic fibroblast growth factor. *Blood* *94*, 663–672.
- Bazot, Q., Deschamps, T., Tafforeau, L., Siouda, M., Leblanc, P., Harth-Hertle, M.L., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., Kempkes, B., Tommasino, M., et al. (2014). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A protein regulates CDKN2B transcription via interaction with MIZ-1. *Nucleic Acids Res* *42*, 9700–9716.

- Ben Hajj, N., Leghmari, K., Planès, R., Thieblemont, N., and Bahraoui, E. (2013). HIV-1 Tat protein binds to TLR4-MD2 and signals to induce TNF- α and IL-10. *Retrovirology* 10, 123.
- Ben Hajj, N., Planès, R., Leghmari, K., Serrero, M., Delobel, P., Izopet, J., BenMohamed, L., and Bahraoui, E. (2015). HIV-1 Tat Protein Induces Production of Proinflammatory Cytokines by Human Dendritic Cells and Monocytes/Macrophages through Engagement of TLR4-MD2-CD14 Complex and Activation of NF- κ B Pathway. *PLoS One* 10, e0129425.
- Bernardi, R., and Pandolfi, P.P. (2007). Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 1006–1016.
- Bernstein, N.K., Williams, R.S., Rakovszky, M.L., Cui, D., Green, R., Karimi-Busheri, F., Mani, R.S., Galicia, S., Koch, C.A., Cass, C.E., et al. (2005). The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase. *Mol Cell* 17, 657–670.
- Blazevic, V., Heino, M., Lagerstedt, A., Ranki, A., and Krohn, K.J. (1996). Interleukin-10 gene expression induced by HIV-1 Tat and Rev in the cells of HIV-1 infected individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 13, 208–214.
- Blum, K.A., Lozanski, G., and Byrd, J.C. (2004). Adult Burkitt leukemia and lymphoma.
- Boboila, C., Alt, F.W., and Schwer, B. (2012). Classical and alternative end-joining pathways for repair of lymphocyte-specific and general DNA double-strand breaks. *Adv Immunol* 116, 1–49.
- Bohlander, S.K., and Kakadia, P.M. (2015). DNA Repair and Chromosomal Translocations. *Recent Results Cancer Res* 200, 1–37.
- Boisvert, F.M., Hendzel, M.J., and Bazett-Jones, D.P. (2000). Promyelocytic leukemia (PML) nuclear bodies are protein structures that do not accumulate RNA. *J Cell Biol* 148, 283–292.
- Bolzer, A., Kreth, G., Solovei, I., Koehler, D., Saracoglu, K., Fauth, C., Müller, S., Eils, R., Cremer, C., Speicher, M.R., et al. (2005). Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes. *PLoS Biol* 3, e157.
- Bonev, B., and Cavalli, G. (2016). Organization and function of the 3D genome. *Nature Reviews Genetics* 17, 772–772.
- Bornkamm, G.W. (2009). Epstein-Barr virus and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma: More questions than answers. *International Journal of Cancer* 124, 1745–1755.
- Bornkamm, G.W., Polack, A., Eick, D., Berger, R., and Lenoir, G.M. (1987). [Chromosome translocations and Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma]. *Onkologie* 10, 196–204.
- van den Bosch, C., and Lloyd, G. (2000). Chikungunya fever as a risk factor for endemic Burkitt's lymphoma in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94, 704–705.
- van den Bosch, C., Griffin, B.E., Kazembe, P., Dziweni, C., and Kadzamira, L. (1993). Are plant factors a missing link in the evolution of endemic Burkitt's lymphoma? *British Journal of Cancer* 68, 1232–1235.
- Boucher, N., Dufeu-Duchesne, T., Vicaut, E., Farge, D., Effros, R.B., and Schächter, F. (1998). CD28 expression in T cell aging and human longevity. *Exp Gerontol* 33, 267–282.
- Bouvard, V., Baan, R.A., Grosse, Y., Lauby-Secretan, B., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Straif, K., and WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group (2012). Carcinogenicity of malaria and of some polyomaviruses. *Lancet Oncol* 13, 339–340.
- Brady, G., MacArthur, G.J., and Farrell, P.J. (2007). Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *Journal of Clinical Pathology* 60, 1397–1402.
- Branco, M.R., and Pombo, A. (2006). Intermingling of chromosome territories in interphase suggests role in translocations and transcription-dependent associations. *PLoS Biol* 4, e138.
- Brandsma, I., and Gent, D.C. (2012). Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. *Genome Integr* 3, 9.
- Breen, E.C., Fatahi, S., Epeldegui, M., Boscardin, W.J., Detels, R., and Martínez-Maza, O. (2006). Elevated serum soluble CD30 precedes the development of AIDS-associated non-Hodgkin's B cell lymphoma. *Tumour Biol* 27, 187–194.

- Breen, E.C., Hussain, S.K., Magpantay, L., Jacobson, L.P., Detels, R., Rabkin, C.S., Kaslow, R.A., Variakojis, D., Bream, J.H., Rinaldo, C.R., et al. (2011). B-cell stimulatory cytokines and markers of immune activation are elevated several years prior to the diagnosis of systemic AIDS-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20, 1303–1314.
- Brouwer, I., Sitters, G., Candelli, A., Heerema, S.J., Heller, I., de Melo, A.J., Zhang, H., Normanno, D., Modesti, M., Peterman, E.J.G., et al. (2016). Sliding sleeves of XRCC4-XLF bridge DNA and connect fragments of broken DNA. *Nature* 535, 566–569.
- Burdick, R.C., Li, C., Munshi, M., Rawson, J.M.O., Nagashima, K., Hu, W.-S., and Pathak, V.K. (2020). HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 5486–5493.
- Burkitt, D. (1958). A sarcoma involving the jaws in african children. *British Journal of Surgery* 46, 218–223.
- Burkitt, D. (1962a). Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *Br Med J* 2, 1019–1023.
- Burkitt, D. (1962b). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* 194, 232–234.
- Burkitt, D. (1962c). A "tumour safari" in East and Central Africa. *Br J Cancer* 16, 379–386.
- Burkitt, D.P. (1969). Etiology of Burkitt's lymphoma--an alternative hypothesis to a vectored virus. *J Natl Cancer Inst* 42, 19–28.
- Burmeister, T., Molkentin, M., Schwartz, S., Gökbüget, N., Hoelzer, D., Thiel, E., and Reinhardt, R. (2013). Erroneous class switching and false VDJ recombination: molecular dissection of t(8;14)/MYC-IGH translocations in Burkitt-type lymphoblastic leukemia/B-cell lymphoma. *Mol Oncol* 7, 850–858.
- Byrne, M., Wray, J., Reinert, B., Wu, Y., Nickoloff, J., Lee, S.H., Hromas, R., and Williamson, E. (2014). Mechanisms of oncogenic chromosomal translocations. *Annals of the New York Academy of Sciences*.
- Caccuri, F., Giagulli, C., Bugatti, A., Benetti, A., Alessandri, G., Ribatti, D., Marsico, S., Apostoli, P., Slevin, M.A., Rusnati, M., et al. (2012). HIV-1 matrix protein p17 promotes angiogenesis via chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 14580–14585.
- Cai, X., Schäfer, A., Lu, S., Bilello, J.P., Desrosiers, R.C., Edwards, R., Raab-Traub, N., and Cullen, B.R. (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2, e23.
- Campbell, G.R., Pasquier, E., Watkins, J., Bourgarel-Rey, V., Peyrot, V., Esquieu, D., Barbier, P., de Mareuil, J., Braguer, D., Kaleebu, P., et al. (2004). The glutamine-rich region of the HIV-1 Tat protein is involved in T-cell apoptosis. *J Biol Chem* 279, 48197–48204.
- Campbell, G.R., Watkins, J.D., Singh, K.K., Loret, E.P., and Spector, S.A. (2007). Human immunodeficiency virus type 1 subtype C Tat fails to induce intracellular calcium flux and induces reduced tumor necrosis factor production from monocytes. *J Virol* 81, 5919–5928.
- Campion, E.M., Hakimjavadi, R., Loughran, S.T., Phelan, S., Smith, S.M., D'Souza, B.N., Tierney, R.J., Bell, A.I., Cahill, P.A., and Walls, D. (2014). Repression of the proapoptotic cellular BIK/NBK gene by Epstein-Barr virus antagonizes transforming growth factor β 1-induced B-cell apoptosis. *J Virol* 88, 5001–5013.
- Canoy, R.J., André, F., Shmakova, A., Wiels, J., Lipinski, M., Vassetzky, Y., and Germini, D. (2020). Easy and robust electrotransfection protocol for efficient ectopic gene expression and genome editing in human B cells. *Gene Ther*.
- Cao, J.Y., Mansouri, S., and Frappier, L. (2012). Changes in the nasopharyngeal carcinoma nuclear proteome induced by the EBNA1 protein of Epstein-Barr virus reveal potential roles for EBNA1 in metastasis and oxidative stress responses. *J Virol* 86, 382–394.
- Capolunghi, F., Cascioli, S., Giorda, E., Rosado, M.M., Plebani, A., Auriti, C., Seganti, G., Zuntini, R., Ferrari, S., Cagliuso, M., et al. (2008). CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies. *J Immunol* 180, 800–808.
- Caridi, C.P., D'Agostino, C., Ryu, T., Zapotoczny, G., Delabaere, L., Li, X., Khodaverdian, V.Y., Amaral, N., Lin, E., Rau, A.R., et al. (2018). Nuclear F-actin and myosins drive relocalization of heterochromatic breaks. *Nature* 559, 54–60.
- Carpenter, L.M., Newton, R., Casabonne, D., Ziegler, J., Mbulaiteye, S., Mbide, E., Wabinga, H., Jaffe, H., and Beral, V. (2008). Antibodies against malaria and Epstein-Barr virus in childhood Burkitt lymphoma: A case-control study in Uganda. *International Journal of Cancer* 122, 1319–1323.

- Carroll, V.A., Lafferty, M.K., Marchionni, L., Bryant, J.L., Gallo, R.C., and Garzino-Demo, A. (2016). Expression of HIV-1 matrix protein p17 and association with B-cell lymphoma in HIV-1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 13168–13173.
- Casareale, D., Sinangil, F., Hedeskog, M., Ward, W., Volsky, D.J., and Sonabend, J. (1983). ESTABLISHMENT OF RETROVIRUS-, EPSTEIN-BARR VIRUS-POSITIVE B-LYMPHOBLASTOID CELL LINES DERIVED FROM INDIVIDUALS AT RISK FOR ACQUIRED IMMUNE DEFICIENCY SYNDROME (AIDS). *AIDS Research* *1*, 253–270.
- Casellas, R., Basu, U., Yewdell, W.T., Chaudhuri, J., Robbiani, D.F., and Di Noia, J.M. (2016). Mutations, kataegis and translocations in B cells: understanding AID promiscuous activity. *Nat Rev Immunol* *16*, 164–176.
- Castro-Nallar, E., Crandall, K.A., and Pérez-Losada, M. (2012). Genetic diversity and molecular epidemiology of HIV transmission. *Future Virology* *7*, 239–252.
- Casulo, C., and Friedberg, J.W. (2018). Burkitt lymphoma- a rare but challenging lymphoma. *Best Pract Res Clin Haematol* *31*, 279–284.
- Cavalli, G., and Misteli, T. (2013). Functional implications of genome topology. *Nature Publishing Group* *20*.
- Cesarman, E., Dalla-Favera, R., Bentley, D., and Groudine, M. (1987). Mutations in the first exon are associated with altered transcription of c-myc in Burkitt lymphoma. *Science* *238*, 1272–1275.
- Chakravorty, D., Jana, T., Das Mandal, S., Seth, A., Bhattacharya, A., and Saha, S. (2017). MYCbase: a database of functional sites and biochemical properties of Myc in both normal and cancer cells. *BMC Bioinformatics* *18*, 224.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., and Lieber, M.R. (2017). Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* *18*, 495–506.
- Chapman, C.J., Wright, D., and Stevenson, F.K. (1998). Insight into Burkitt's lymphoma from immunoglobulin variable region gene analysis. *Leuk Lymphoma* *30*, 257–267.
- Chapman, J.R., Taylor, M.R.G., and Boulton, S.J. (2012). Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell* *47*, 497–510.
- Chatterjee, N., and Walker, G.C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* *58*, 235–263.
- Chattopadhyay, P.K., Chelimo, K., Embury, P.B., Mulama, D.H., Sumba, P.O., Gostick, E., Ladell, K., Brodie, T.M., Vulule, J., Roederer, M., et al. (2013). Holoendemic Malaria Exposure Is Associated with Altered Epstein-Barr Virus-Specific CD8+ T-Cell Differentiation. *Journal of Virology* *87*, 1779–1788.
- Chen, A., DiVisconte, M., Jiang, X., Quink, C., and Wang, F. (2005). Epstein-Barr Virus with the Latent Infection Nuclear Antigen 3B Completely Deleted Is Still Competent for B-Cell Growth Transformation In Vitro. *J. Virol.* *79*, 4506–4509.
- Chen, B., Yusuf, M., Hashimoto, T., Estandarte, A.K., Thompson, G., and Robinson, I. (2017). Three-dimensional positioning and structure of chromosomes in a human prophase nucleus. *Science Advances* *3*, e1602231.
- Chen, H., Smith, P., Ambinder, R.F., and Hayward, S.D. (1999). Expression of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts in latently infected B cells from peripheral blood. *Blood* *93*, 3026–3032.
- Chen, J., Sathiyamoorthy, K., Zhang, X., Schaller, S., Perez White, B.E., Jardetzky, T.S., and Longnecker, R. (2018). Ephrin receptor A2 is a functional entry receptor for Epstein-Barr virus. *Nat Microbiol* *3*, 172–180.
- Chen, P., Chen, B.K., Mosoian, A., Hays, T., Ross, M.J., Klotman, P.E., and Klotman, M.E. (2011). Virological Synapses Allow HIV-1 Uptake and Gene Expression in Renal Tubular Epithelial Cells. *JASN* *22*, 496–507.
- Chen, X., Cheng, L., Jia, X., Zeng, Y., Yao, S., Lv, Z., Qin, D., Fang, X., Lei, Y., and Lu, C. (2009). Human immunodeficiency virus type 1 Tat accelerates Kaposi sarcoma-associated herpesvirus Kaposin A-mediated tumorigenesis of transformed fibroblasts in vitro as well as in nude and immunocompetent mice. *Neoplasia (New York, N.Y.)* *11*, 1272–1284.
- Chêne, A., Donati, D., Guerreiro-Cacais, A.O., Levitsky, V., Chen, Q., Falk, K.I., Orem, J., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2007). A molecular link between malaria and Epstein-Barr virus reactivation. *PLoS Pathogens* *3*, 0826–0834.

- Chene, A., Donati, D., Orem, J., Mbidde, E.R., Kironde, F., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2009). Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease: new insights on the interaction between *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus. *Semin Cancer Biol* 19, 411–420.
- Chew, M.M.S., Gan, S.-Y., Khoo, A.S.B., and Tan, E.-L. (2010). Interleukins, laminin and Epstein - Barr virus latent membrane protein 1 (EBV LMP1) promote metastatic phenotype in nasopharyngeal carcinoma. *BMC Cancer* 10, 574.
- Chiang, A.K., Tao, Q., Srivastava, G., and Ho, F.C. (1996). Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int J Cancer* 68, 285–290.
- Chiarle, R. (2013). Translocations in Normal B Cells and Cancers. Insights from New Technical Approaches. *Advances in Immunology*.
- Chiozzini, C., and Toschi, E. (2016). HIV-1 TAT and IMMUNE DYSREGULATION in AIDS PATHOGENESIS: a THERAPEUTIC TARGET. *Curr Drug Targets* 17, 33–45.
- Chiu, Y.-F., and Sugden, B. (2016). Epstein-Barr Virus: The Path from Latent to Productive Infection. *Annu Rev Virol* 3, 359–372.
- Choi, J.Y., Hightower, G.K., Wong, J.K., Heaton, R., Woods, S., Grant, I., Marcotte, T.D., Ellis, R.J., Letendre, S.L., Collier, A.C., et al. (2012). Genetic features of cerebrospinal fluid-derived subtype B HIV-1 tat. *J Neurovirol* 18, 81–90.
- Chou, D.M., Adamson, B., Dephoure, N.E., Tan, X., Nottke, A.C., Hurov, K.E., Gygi, S.P., Colaiácovo, M.P., and Elledge, S.J. (2010). A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 18475–18480.
- Clark, E., Nava, B., and Caputi, M. (2017). Tat is a multifunctional viral protein that modulates cellular gene expression and functions. *Oncotarget* 8, 27569–27581.
- Coghill, A.E., Proietti, C., Liu, Z., Krause, L., Bethony, J., Prokunina-Olsson, L., Obajemu, A., Nkrumah, F., Biggar, R.J., Bhatia, K., et al. (2020). The Association between the Comprehensive Epstein-Barr Virus Serologic Profile and Endemic Burkitt Lymphoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 29, 57–62.
- Cohen, J.I. (2000). Epstein-Barr virus infection. *N Engl J Med* 343, 481–492.
- Cohen, J.I., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. (1989). Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 9558–9562.
- Coleman, C.B., Lang, J., Sweet, L.A., Smith, N.A., Freed, B.M., Pan, Z., Haverkos, B., Pelanda, R., and Rochford, R. (2018). Epstein-Barr Virus Type 2 Infects T Cells and Induces B Cell Lymphomagenesis in Humanized Mice. *J Virol* 92.
- Colombrino, E., Rossi, E., Ballon, G., Terrin, L., Indraccolo, S., Chieco-Bianchi, L., and De Rossi, A. (2004). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein modulates cell cycle and apoptosis in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Exp Cell Res* 295, 539–548.
- Compston, J. (2015). HIV infection and osteoporosis. *Bonekey Rep* 4, 636.
- Corallini, A., Altavilla, G., Pozzi, L., Bignozzi, F., Negrini, M., Rimessi, P., Gualandi, F., and Barbanti-Brodano, G. (1993). Systemic expression of HIV-1 tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res* 53, 5569–5575.
- Corneo, B., Wendland, R.L., Deriano, L., Cui, X., Klein, I.A., Wong, S.-Y., Arnal, S., Holub, A.J., Weller, G.R., Pancake, B.A., et al. (2007). Rag mutations reveal robust alternative end joining. *Nature* 449, 483–486.
- Correa, R.M., Fellner, M.D., Alonio, L.V., Durand, K., Teyssié, A.R., and Picconi, M.A. (2004). Epstein-barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* 73, 583–588.
- Countryman, J., and Miller, G. (1985). Activation of expression of latent Epstein-Barr herpesvirus after gene transfer with a small cloned subfragment of heterogeneous viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4085–4089.
- Cremer, M., Küpper, K., Wagler, B., Wizelman, L., von Hase, J., Weiland, Y., Kreja, L., Diebold, J., Speicher, M.R., and Cremer, T. (2003). Inheritance of gene density-related higher order chromatin arrangements in normal and tumor cell nuclei. *J Cell Biol* 162, 809–820.

- Dalla-Favera, R., Bregni, M., Erikson, J., Patterson, D., Gallo, R.C., and Croce, C.M. (1982). Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 7824–7827.
- Dalldorf, G., Linsell, C.A., Barnhart, F.E., and Martyn, R. (1964). AN EPIDEMIOLOGIC APPROACH TO THE LYMPHOMAS OF AFRICAN CHILDREN AND BURKITT'S SACROMA OF THE JAWS. *Perspect Biol Med* 7, 435–449.
- Dambaugh, T., Raab-Traub, N., Heller, M., Beisel, C., Hummel, M., Cheung, A., Fennewald, S., King, W., and Kieff, E. (1980). Variations among isolates of Epstein-Barr virus. *Ann N Y Acad Sci* 354, 309–325.
- Dandachi, D., and Morón, F. (2020). Effects of HIV on the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol* 1263, 45–54.
- Dang, C.V., O'Donnell, K.A., Zeller, K.I., Nguyen, T., Osthus, R.C., and Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Semin Cancer Biol* 16, 253–264.
- Dantuma, N.P., Heessen, S., Lindsten, K., Jellne, M., and Masucci, M.G. (2000). Inhibition of proteasomal degradation by the gly-Ala repeat of Epstein-Barr virus is influenced by the length of the repeat and the strength of the degradation signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 8381–8385.
- Dave, S.S., Fu, K., Wright, G.W., Lam, L.T., Kluin, P., Boerma, E.-J., Greiner, T.C., Weisenburger, D.D., Rosenwald, A., Ott, G., et al. (2006). Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N Engl J Med* 354, 2431–2442.
- Davies, J.N.P. (1947). Pathology of Central African natives; Mulago Hospital post mortem studies. *East Afr Med J* 24, 437–449.
- Davies, A.H., Grand, R.J., Evans, F.J., and Rickinson, A.B. (1991). Induction of Epstein-Barr virus lytic cycle by tumor-promoting and non-tumor-promoting phorbol esters requires active protein kinase C. *J Virol* 65, 6838–6844.
- Deacon, E.M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A.B., and Young, L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 177, 339–349.
- Delecluse, S., Poirey, R., Zeier, M., Schnitzler, P., Behrends, U., Tsai, M.-H., and Delecluse, H.-J. (2020). Identification and Cloning of a New Western Epstein-Barr Virus Strain That Efficiently Replicates in Primary B Cells. *J Virol* 94.
- Deng, L., de la Fuente, C., Fu, P., Wang, L., Donnelly, R., Wade, J.D., Lambert, P., Li, H., Lee, C.G., and Kashanchi, F. (2000). Acetylation of HIV-1 Tat by CBP/P300 increases transcription of integrated HIV-1 genome and enhances binding to core histones. *Virology* 277, 278–295.
- Deriano, L., and Roth, D.B. (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu. Rev. Genet.* 47, 433–455.
- Deschamps, T., Bazot, Q., Leske, D.M., MacLeod, R., Mompelat, D., Tafforeau, L., Lotteau, V., Maréchal, V., Baillie, G.S., Gruffat, H., et al. (2017). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 interacts with regulator of chromosome condensation 1 dynamically throughout the cell cycle. *J Gen Virol* 98, 251–265.
- Dharan, A., Bachmann, N., Talley, S., Zwickelmaier, V., and Campbell, E.M. (2020). Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol* 5, 1088–1095.
- Difilippantonio, M.J., Petersen, S., Chen, H.T., Johnson, R., Jasin, M., Kanaar, R., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2002). Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J Exp Med* 196, 469–480.
- Dion, V., Kalck, V., Horigome, C., Towbin, B.D., and Gasser, S.M. (2012). Increased mobility of double-strand breaks requires Mec1, Rad9 and the homologous recombination machinery. *Nat Cell Biol* 14, 502–509.
- Dixon, J.R., Selvaraj, S., Yue, F., Kim, A., Li, Y., Shen, Y., Hu, M., Liu, J.S., and Ren, B. (2012). Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380.
- Doğan, E.S., and Liu, C. (2018). Three-dimensional chromatin packing and positioning of plant genomes. *Nat Plants* 4, 521–529.
- Dolan, A., Addison, C., Gatherer, D., Davison, A.J., and McGeoch, D.J. (2006). The genome of Epstein-Barr virus type 2 strain AG876. *Virology* 350, 164–170.

- Dolcetti, R., Dal Col, J., Martorelli, D., Carbone, A., and Klein, E. (2013). Interplay among viral antigens, cellular pathways and tumor microenvironment in the pathogenesis of EBV-driven lymphomas. *Seminars in Cancer Biology* 23, 441–456.
- Dolcetti, R., Gloghini, A., Caruso, A., and Carbone, A. (2016). A lymphomagenic role for HIV beyond immune suppression? *Blood* 127, 1403–1409.
- Doll, D.C., and List, A.F. (1982). Burkitt's lymphoma in a homosexual. *Lancet* 1, 1026–1027.
- Donati, D., Zhang, L.P., Chêne, A., Chen, Q., Flick, K., Nyström, M., Wahlgren, M., and Bejarano, M.T. (2004). Identification of a polyclonal B-cell activator in *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun* 72, 5412–5418.
- Dorsett, Y., Robbiani, D.F., Jankovic, M., Reina-San-Martin, B., Eisenreich, T.R., and Nussenzweig, M.C. (2007). A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *The Journal of Experimental Medicine* 204, 2225–2232.
- Easley, R., Van Duyne, R., Coley, W., Guendel, I., Dadgar, S., Kehn-Hall, K., and Kashanchi, F. (2010). Chromatin dynamics associated with HIV-1 Tat-activated transcription. *Biochim Biophys Acta* 1799, 275–285.
- Eclache, V., Magnac, C., Pritsch, O., Delecluse, H.J., Davi, F., Raphaël, M., and Dighiero, G. (1996). Complete nucleotide sequence of Ig V genes in three cases of Burkitt lymphoma associated with AIDS. *Leuk Lymphoma* 20, 281–290.
- Effros, R.B., Fletcher, C.V., Gebo, K., Halter, J.B., Hazzard, W.R., Horne, F.M., Huebner, R.E., Janoff, E.N., Justice, A.C., Kuritzkes, D., et al. (2008). Aging and infectious diseases: workshop on HIV infection and aging: what is known and future research directions. *Clin Infect Dis* 47, 542–553.
- Eggers, C., Arendt, G., Hahn, K., Husstedt, I.W., Maschke, M., Neuen-Jacob, E., Obermann, M., Rosenkranz, T., Schielke, E., Straube, E., et al. (2017). HIV-1-associated neurocognitive disorder: epidemiology, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *J Neurol* 264, 1715–1727.
- Ehlin-Henriksson, B., Gordon, J., and Klein, G. (2003). B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* 108, 427–430.
- Eischen, C.M., Weber, J.D., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Cleveland, J.L. (1999). Disruption of the ARF-Mdm2-p53 tumor suppressor pathway in Myc-induced lymphomagenesis. *Genes Dev* 13, 2658–2669.
- El-Amine, R., Germini, D., Zakharova, V.V., Tsfasman, T., Sheval, E.V., Louzada, R.A.N., Dupuy, C., Bilhou-Nabera, C., Hamade, A., Najjar, F., et al. (2018). HIV-1 Tat protein induces DNA damage in human peripheral blood B-lymphocytes via mitochondrial ROS production. *Redox Biology* 15, 97–108.
- Elmes, B.G.T., and Baldwin, R.B.T. (1947). Malignant disease in Nigeria; an analysis of a thousand tumours. *Ann Trop Med Parasitol* 41, 321–328.
- El-Sharkawy, A., Al Zaidan, L., and Malki, A. (2018). Epstein-Barr Virus-Associated Malignancies: Roles of Viral Oncoproteins in Carcinogenesis. *Front Oncol* 8, 265.
- Emmanuel, B., Kawira, E., Ogwang, M.D., Wabinga, H., Magatti, J., Nkrumah, F., Neequaye, J., Bhatia, K., Brubaker, G., Biggar, R.J., et al. (2011). African Burkitt lymphoma: age-specific risk and correlations with malaria biomarkers. *Am J Trop Med Hyg* 84, 397–401.
- Engin, A.B., and Engin, A. (2019). DNA damage checkpoint response to aflatoxin B1.
- Ensoli, B., Barillari, G., Salahuddin, S.Z., Gallo, R.C., and Wong-Staal, F. (1990). Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature* 345, 84–86.
- Epeldegui, M., Breen, E.C., Hung, Y.P., Boscardin, W.J., Detels, R., and Martínez-Maza, O. (2007). Elevated expression of activation induced cytidine deaminase in peripheral blood mononuclear cells precedes AIDS-NHL diagnosis. *AIDS (London, England)* 21, 2265–2270.
- Epstein, M.A., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1964). VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *Lancet* 1, 702–703.
- Epstein, M.A., Henle, G., Achong, B.G., and Barr, Y.M. (1965). MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J Exp Med* 121, 761–770.

- Ersing, I., Nobre, L., Wang, L.W., Soddy, L., Ma, Y., Paulo, J.A., Narita, Y., Ashbaugh, C.W., Jiang, C., Grayson, N.E., et al. (2017). A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. *Cell Reports* 19, 1479–1493.
- Faller, E.M., Sugden, S.M., McVey, M.J., Kakal, J.A., and MacPherson, P.A. (2010). Soluble HIV Tat protein removes the IL-7 receptor alpha-chain from the surface of resting CD8 T cells and targets it for degradation. *J Immunol* 185, 2854–2866.
- Faller, E.M., McVey, M.J., and MacPherson, P.A. (2014). IL-7 receptor recovery on CD8 T-cells isolated from HIV+ patients is inhibited by the HIV Tat protein. *PLoS One* 9, e102677.
- Farrell, P.J. (2015). Epstein-Barr Virus Strain Variation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 45–69.
- Farrell, P.J. (2019). Epstein-Barr Virus and Cancer. *Annu Rev Pathol* 14, 29–53.
- Fatakia, S.N., Kulashreshtha, M., Mehta, I.S., and Rao, B.J. (2017). Chromosome territory relocation paradigm during DNA damage response: Some insights from molecular biology to physics. *Nucleus* 8, 449–460.
- Fathallah, I., Parroche, P., Gruffat, H., Zannetti, C., Johansson, H., Yue, J., Manet, E., Tommasino, M., Sylla, B.S., and Hasan, U.A. (2010). EBV latent membrane protein 1 is a negative regulator of TLR9. *J Immunol* 185, 6439–6447.
- Feederle, R., Haar, J., Bernhardt, K., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011a). The members of an Epstein-Barr virus microRNA cluster cooperate to transform B lymphocytes. *J Virol* 85, 9801–9810.
- Feederle, R., Linnstaedt, S.D., Bannert, H., Lips, H., Bencun, M., Cullen, B.R., and Delecluse, H.-J. (2011b). A viral microRNA cluster strongly potentiates the transforming properties of a human herpesvirus. *PLoS Pathog* 7, e1001294.
- Felsenfeld, G., and Groudine, M. (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448–453.
- Ferdin, J., Goričar, K., Dolžan, V., Plemenitaš, A., Martin, J.N., Peterlin, B.M., Deeks, S.G., and Lenassi, M. (2018). Viral protein Nef is detected in plasma of half of HIV-infected adults with undetectable plasma HIV RNA. *PLoS One* 13, e0191613.
- Ferry, J.A. (2006). Burkitt's Lymphoma: Clinicopathologic Features and Differential Diagnosis. *The Oncologist* 11, 375–383.
- Fiume, G., Scialdone, A., Albano, F., Rossi, A., Tuccillo, F.M., Rea, D., Palmieri, C., Caiazzo, E., Cicala, C., Bellevicene, C., et al. (2015). Impairment of T cell development and acute inflammatory response in HIV-1 Tat transgenic mice. *Sci Rep* 5, 13864.
- Flett, F.J., Ruksenaite, E., Armstrong, L.A., Bharati, S., Carloni, R., Morris, E.R., Mackay, C.L., Interthal, H., and Richardson, J.M. (2018). Structural basis for DNA 3'-end processing by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1. *Nat Commun* 9, 24.
- Flinn, E.M., Busch, C.M., and Wright, A.P. (1998). myc boxes, which are conserved in myc family proteins, are signals for protein degradation via the proteasome. *Mol Cell Biol* 18, 5961–5969.
- Forte, E., and Luftig, M.A. (2011). The role of microRNAs in Epstein-Barr virus latency and lytic reactivation. *Microbes Infect* 13, 1156–1167.
- Frank, D., Cesarman, E., Liu, Y.F., Michler, R.E., and Knowles, D.M. (1995). Posttransplantation lymphoproliferative disorders frequently contain type A and not type B Epstein-Barr virus. *Blood* 85, 1396–1403.
- Frappier, L. (2012). Contributions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 (EBNA1) to cell immortalization and survival. *Viruses* 4, 1537–1547.
- Fries, K.L., Miller, W.E., and Raab-Traub, N. (1996). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 blocks p53-mediated apoptosis through the induction of the A20 gene. *J Virol* 70, 8653–8659.
- Fritsch, L., Marechal, V., Schneider, V., Barthet, C., Rozenbaum, W., Moisan-Coppey, M., Coppey, J., and Nicolas, J.C. (1998). Production of HIV-1 by Human B Cells Infected in Vitro: Characterization of an EBV Genome-Negative B Cell Line Chronically Synthesizing a Low Level of HIV-1 after Infection. *Virology* 244, 542–551.
- Fukuda, M., and Longnecker, R. (2005). Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol* 79, 8655–8660.
- Gameiro, J., Jorge, S., and Lopes, J.A. (2018). HIV and renal disease: a contemporary review. *Int J STD AIDS* 29, 714–719.

- Germi, R., Baccard, M., Seigneurin, J.-M., and Morand, P. (2011). Infections à virus Epstein-Barr. EMC - Maladies infectieuses 8, 1–14.
- Germini, D., Tsfasman, T., Klibi, M., El-Amine, R., Pichugin, A., Iarovaia, O.V., Bilhou-Nabera, C., Subra, F., Bou Saada, Y., Sukhanova, A., et al. (2017). HIV Tat induces a prolonged MYC relocalization next to IGH in circulating B-cells. *Leukemia* 31, 2515–2522.
- Germini, D., Sall, F.B., Shmakova, A., Wiels, J., Dokudovskaya, S., Drouet, E., and Vassetzky, Y. (2020). Oncogenic Properties of the EBV ZEBRA Protein. *Cancers (Basel)* 12.
- Geser, A., de Thé, G., Lenoir, G., Day, N.E., and Williams, E.H. (1982). Final case reporting from the Ugandan prospective study of the relationship between EBV and Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 29, 397–400.
- Geyer, P.K., Vitalini, M.W., and Wallrath, L.L. (2011). Nuclear organization: taking a position on gene expression. *Curr Opin Cell Biol* 23, 354–359.
- Giacca, M. (2005). HIV-1 Tat, apoptosis and the mitochondria: a tubulin link? *Retrovirology* 2, 7.
- Giagulli, C., Magiera, A.K., Bugatti, A., Caccuri, F., Marsico, S., Rusnati, M., Vermi, W., Fiorentini, S., and Caruso, A. (2012). HIV-1 matrix protein p17 binds to the IL-8 receptor CXCR1 and shows IL-8-like chemokine activity on monocytes through Rho/ROCK activation. *Blood* 119, 2274–2283.
- Gibellini, D., Caputo, A., Celeghini, C., Bassini, A., La Placa, M., Capitani, S., and Zauli, G. (1995). Tat-expressing Jurkat cells show an increased resistance to different apoptotic stimuli, including acute human immunodeficiency virus-type 1 (HIV-1) infection. *Br J Haematol* 89, 24–33.
- Gibson, T.M., Morton, L.M., Shiels, M.S., Clarke, C.A., and Engels, E.A. (2014). Risk of non-Hodgkin lymphoma subtypes in HIV-infected people during the HAART era: a population-based study. *AIDS (London, England)* 28, 2313–2318.
- Gladdy, R.A., Taylor, M.D., Williams, C.J., Grandal, I., Karaskova, J., Squire, J.A., Rutka, J.T., Guidos, C.J., and Danska, J.S. (2003). The RAG-1/2 endonuclease causes genomic instability and controls CNS complications of lymphoblastic leukemia in p53/Prkdc-deficient mice. *Cancer Cell* 3, 37–50.
- Gnanasundram, S.V., Pyndiah, S., Daskalogianni, C., Armfield, K., Nylander, K., Wilson, J.B., and Fåhræus, R. (2017). PI3Kδ activates E2F1 synthesis in response to mRNA translation stress. *Nat Commun* 8, 2103.
- Goldschmidts, W.L., Bhatia, K., Johnson, J.F., Akar, N., Gutiérrez, M.I., Shibata, D., Carolan, M., Levine, A., and Magrath, I.T. (1992). Epstein-Barr virus genotypes in AIDS-associated lymphomas are similar to those in endemic Burkitt's lymphomas. *Leukemia* 6, 875–878.
- Gong, J.Z., Stenzel, T.T., Bennett, E.R., Lagoo, A.S., Dunphy, C.H., Moore, J.O., Rizzieri, D.A., Tepperberg, J.H., Papenhausen, P., and Buckley, P.J. (2003). Burkitt lymphoma arising in organ transplant recipients: a clinicopathologic study of five cases. *Am J Surg Pathol* 27, 818–827.
- Goodarzi, A.A., Yu, Y., Riballo, E., Douglas, P., Walker, S.A., Ye, R., Härer, C., Marchetti, C., Morrice, N., Jeggo, P.A., et al. (2006). DNA-PK autophosphorylation facilitates Artemis endonuclease activity. *EMBO J* 25, 3880–3889.
- Gostissa, M., Alt, F.W., and Chiarle, R. (2011). Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 29, 319–350.
- Graham, B.S., and Lynch, D.T. (2020). Burkitt Lymphoma. In *StatPearls*, (Treasure Island (FL): StatPearls Publishing), p.
- Grande, B.M., Gerhard, D.S., Jiang, A., Griner, N.B., Abramson, J.S., Alexander, T.B., Allen, H., Ayers, L.W., Bethony, J.M., Bhatia, K., et al. (2019). Genome-wide discovery of somatic coding and noncoding mutations in pediatric endemic and sporadic Burkitt lymphoma. *Blood* 133, 1313–1324.
- Gras, G.S., and Dormont, D. (1991). Antibody-dependent and antibody-independent complement-mediated enhancement of human immunodeficiency virus type 1 infection in a human, Epstein-Barr virus-transformed B-lymphocytic cell line. *Journal of Virology* 65, 541–545.
- Gras, G., Richard, Y., Roques, P., Olivier, R., and Dormont, D. (1993). Complement and virus-specific antibody-dependent infection of normal B lymphocytes by human immunodeficiency virus type 1. *Blood* 81, 1808–1818.

- Gras, G., Legendre, C., Krzysiek, R., Dormont, D., Galanaud, P., and Richard, Y. (1996). CD40/CD40L Interactions and Cytokines Regulate HIV Replication in B Cells *in Vitro*. *Virology* *220*, 309–319.
- Greenway, A.L., McPhee, D.A., Allen, K., Johnstone, R., Holloway, G., Mills, J., Azad, A., Sankovich, S., and Lambert, P. (2002). Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis. *J Virol* *76*, 2692–2702.
- Gregory, M.A., and Hann, S.R. (2000). c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol* *20*, 2423–2435.
- Grogan, E., Jenson, H., Countryman, J., Heston, L., Gradoville, L., and Miller, G. (1987). Transfection of a rearranged viral DNA fragment, WZhet, stably converts latent Epstein-Barr viral infection to productive infection in lymphoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 1332–1336.
- Gruffat, H., Batisse, J., Pich, D., Neuhierl, B., Manet, E., Hammerschmidt, W., and Sergeant, A. (2002). Epstein-Barr virus mRNA export factor EB2 is essential for production of infectious virus. *J Virol* *76*, 9635–9644.
- Gruhne, B., Sompallae, R., Marescotti, D., Kamranvar, S., Gastaldello, S., and Masucci, M. (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 2313–2318.
- Grulich, A.E., Wan, X., Law, M.G., Milliken, S.T., Lewis, C.R., Garsia, R.J., Gold, J., Finlayson, R.J., Cooper, D.A., and Kaldor, J.M. (2000). B-cell stimulation and prolonged immune deficiency are risk factors for non-Hodgkin's lymphoma in people with AIDS. *AIDS* *14*, 133–140.
- Grundy, G.J., Rulten, S.L., Zeng, Z., Arribas-Bosacoma, R., Iles, N., Manley, K., Oliver, A., and Caldecott, K.W. (2013). APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes. *EMBO J* *32*, 112–125.
- Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., and Lieber, M.R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J* *26*, 1010–1023.
- Guech-Ongey, M., Yagi, M., Palacpac, N.M.Q., Emmanuel, B., Talisuna, A.O., Bhatia, K., Stefan, D.C., Biggar, R.J., Nkrumah, F., Neequaye, J., et al. (2012). Antibodies reactive to Plasmodium falciparum serine repeat antigen in children with Burkitt lymphoma from Ghana. *Int J Cancer* *130*, 1908–1914.
- Guo, R., Jiang, C., Zhang, Y., Govande, A., Trudeau, S.J., Chen, F., Fry, C.J., Puri, R., Wolinsky, E., Schineller, M., et al. (2020). MYC Controls the Epstein-Barr Virus Lytic Switch. *Mol Cell* *78*, 653–669.e8.
- Gupta, M.K., Kaminski, R., Mullen, B., Gordon, J., Burdo, T.H., Cheung, J.Y., Feldman, A.M., Madesh, M., and Khalili, K. (2017). HIV-1 Nef-induced cardiotoxicity through dysregulation of autophagy. *Sci Rep* *7*, 8572.
- Haan, K.M., Kwok, W.W., Longnecker, R., and Speck, P. (2000). Epstein-Barr Virus Entry Utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a Coreceptor. *J. Virol.* *74*, 2451–2454.
- Habib, M., Buisson, M., Lupo, J., Agbalika, F., Socié, G., Germi, R., Baccard, M., Imbert-Marcille, B.-M., Dantal, J., Morand, P., et al. (2017). Lytic EBV infection investigated by detection of Soluble Epstein-Barr virus ZEBRA in the serum of patients with PTLN. *Sci Rep* *7*, 10479.
- Haddow, A.J. (1963). AN IMPROVED MAP FOR THE STUDY OF BURKITT'S LYMPHOMA SYNDROME IN AFRICA. *East Afr Med J* *40*, 429–432.
- Haluska, F.G., Finver, S., Tsujimoto, Y., and Croce, C.M. (1986). The t(8; 14) chromosomal translocation occurring in B-cell malignancies results from mistakes in V-D-J joining. *Nature* *324*, 158–161.
- Hämmerl, L., Colombet, M., Rochford, R., Ogwang, D.M., and Parkin, D.M. (2019). The burden of Burkitt lymphoma in Africa. *Infect Agent Cancer* *14*, 17.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* *340*, 393–397.
- Han, S., Dillon, S.R., Zheng, B., Shimoda, M., Schlissel, M.S., and Kelsoe, G. (1997). V(D)J recombinase activity in a subset of germinal center B lymphocytes. *Science* *278*, 301–305.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hart, D.N., Baker, B.W., Inglis, M.J., Nimmo, J.C., Starling, G.C., Deacon, E., Rowe, M., and Beard, M.E. (1992). Epstein-Barr viral DNA in acute large granular lymphocyte (natural killer) leukemic cells. *Blood* 79, 2116–2123.
- Hatsukari, I., Singh, P., Hitosugi, N., Messmer, D., Valderrama, E., Teichberg, S., Chaung, W., Gross, E., Schmidtmayerova, H., and Singhal, P.C. (2007). DEC-205–Mediated Internalization of HIV-1 Results in the Establishment of Silent Infection in Renal Tubular Cells. *JASN* 18, 780–787.
- Hau, P.M., and Tsao, S.W. (2017). Epstein-Barr Virus Hijacks DNA Damage Response Transducers to Orchestrate Its Life Cycle. *Viruses* 9.
- Hauer, M.H., Seeber, A., Singh, V., Thierry, R., Sack, R., Amitai, A., Kryzhanovska, M., Eglinger, J., Holcman, D., Owen-Hughes, T., et al. (2017). Histone degradation in response to DNA damage enhances chromatin dynamics and recombination rates. *Nat Struct Mol Biol* 24, 99–107.
- Hayday, A.C., Gillies, S.D., Saito, H., Wood, C., Wiman, K., Hayward, W.S., and Tonegawa, S. (1984). Activation of a translocated human c-myc gene by an enhancer in the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature* 307, 334–340.
- He, B., Qiao, X., Klasse, P.J., Chiu, A., Chadburn, A., Knowles, D.M., Moore, J.P., and Cerutti, A. (2006). HIV-1 envelope triggers polyclonal Ig class switch recombination through a CD40-independent mechanism involving BAFF and C-type lectin receptors. *J Immunol* 176, 3931–3941.
- Hearst, S.M., Gilder, A.S., Negi, S.S., Davis, M.D., George, E.M., Whittom, A.A., Toyota, C.G., Husedzinovic, A., Gruss, O.J., and Hebert, M.D. (2009). Cajal-body formation correlates with differential coilin phosphorylation in primary and transformed cell lines. *J Cell Sci* 122, 1872–1881.
- Hecht, J.L., and Aster, J.C. (2000). Molecular biology of Burkitt's lymphoma. *J Clin Oncol* 18, 3707–3721.
- Helmkink, B.A., and Sleckman, B.P. (2012). The response to and repair of RAG-mediated DNA double-strand breaks. *Annu Rev Immunol* 30, 175–202.
- Hemann, M.T., Bric, A., Teruya-Feldstein, J., Herbst, A., Nilsson, J.A., Cordon-Cardo, C., Cleveland, J.L., Tansey, W.P., and Lowe, S.W. (2005). Evasion of the p53 tumour surveillance network by tumour-derived MYC mutants. *Nature* 436, 807–811.
- Henle, W., and Henle, G. (1976). The sero-epidemiology of Epstein-Barr virus. *Adv Pathobiol* 5–17.
- Hernández-Ramírez, R.U., Shiels, M.S., Dubrow, R., and Engels, E.A. (2017). Cancer risk in HIV-infected people in the USA from 1996 to 2012: a population-based, registry-linkage study. *The Lancet HIV* 4.
- Hernandez-Vargas, H., Castelino, J., Silver, M.J., Dominguez-Salas, P., Cros, M.P., Durand, G., Le Calvez-Kelm, F., Prentice, A.M., Wild, C.P., Moore, S.E., et al. (2015). Exposure to aflatoxin B1 in Utero is associated with DNA methylation in white blood cells of infants in The Gambia. *International Journal of Epidemiology* 44, 1238–1248.
- Hernandez-Vargas, H., Gruffat, H., Cros, M.P., Diederichs, A., Sirand, C., Vargas-Ayala, R.C., Jay, A., Durand, G., Le Calvez-Kelm, F., Herceg, Z., et al. (2017). Viral driven epigenetic events alter the expression of cancer-related genes in Epstein-Barr-virus naturally infected Burkitt lymphoma cell lines. *Scientific Reports* 7.
- Hessol, N.A., Martínez-Maza, O., Levine, A.M., Morris, A., Margolick, J.B., Cohen, M.H., Jacobson, L.P., and Seaberg, E.C. (2015). Lung cancer incidence and survival among HIV-infected and uninfected women and men. *AIDS* 29, 1183–1193.
- Hewitt, S.L., High, F.A., Reiner, S.L., Fisher, A.G., and Merkenschlager, M. (2004). Nuclear repositioning marks the selective exclusion of lineage-inappropriate transcription factor loci during T helper cell differentiation. *Eur J Immunol* 34, 3604–3613.
- Hikida, M., Mori, M., Takai, T., Tomochika, K., Hamatani, K., and Ohmori, H. (1996). Reexpression of RAG-1 and RAG-2 genes in activated mature mouse B cells. *Science* 274, 2092–2094.
- Hiratani, I., Ryba, T., Itoh, M., Rathjen, J., Kulik, M., Papp, B., Fussner, E., Bazett-Jones, D.P., Plath, K., Dalton, S., et al. (2010). Genome-wide dynamics of replication timing revealed by in vitro models of mouse embryogenesis. *Genome Res* 20, 155–169.
- Hitt, M.M., Allday, M.J., Hara, T., Karran, L., Jones, M.D., Busson, P., Tursz, T., Ernberg, I., and Griffin, B.E. (1989). EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J* 8, 2639–2651.

- Hjalgrim, H., Friborg, J., and Melbye, M. (2007). The epidemiology of EBV and its association with malignant disease. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Hochberg, D., Middeldorp, J.M., Catalina, M., Sullivan, J.L., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, D.A. (2004). Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 239–244.
- Hoffman, B., and Liebermann, D.A. (2008). Apoptotic signaling by c-MYC. *Oncogene* *27*, 6462–6472.
- Hu, L.F., Zabarovsky, E.R., Chen, F., Cao, S.L., Ernberg, I., Klein, G., and Winberg, G. (1991). Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* *72* (Pt 10), 2399–2409.
- Hui, K.F., Ho, D.N., Tsang, C.M., Middeldorp, J.M., Tsao, G.S.W., and Chiang, A.K.S. (2012). Activation of lytic cycle of Epstein-Barr virus by suberoylanilide hydroxamic acid leads to apoptosis and tumor growth suppression of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* *131*, 1930–1940.
- Hutcheson, R.L., Chakravorty, A., and Sugden, B. (2020). Burkitt Lymphomas Evolve to Escape Dependencies on Epstein-Barr Virus. *Front Cell Infect Microbiol* *10*, 606412.
- Hutchings, I.A., Tierney, R.J., Kelly, G.L., Stylianou, J., Rickinson, A.B., and Bell, A.I. (2006). Methylation status of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI W latent cycle promoter and promoter activity: analysis with novel EBV-positive Burkitt and lymphoblastoid cell lines. *J Virol* *80*, 10700–10711.
- Hutt-Fletcher, L.M. (2007). Epstein-Barr Virus Entry. *JVI* *81*, 7825–7832.
- Hutt-Fletcher, L.M. (2017). The Long and Complicated Relationship between Epstein-Barr Virus and Epithelial Cells. *J. Virol.* *91*.
- Huynh, D., Vincan, E., Mantamadiotis, T., Purcell, D., Chan, C.-K., and Ramsay, R. (2007). Oncogenic properties of HIV-Tat in colorectal cancer cells. *Current HIV Research* *5*, 403–409.
- IARC (1997). Proceedings of the IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Epstein-Barr Virus and Kaposi's Sarcoma Herpesvirus/Human Herpesvirus 8. Lyon, France, 17–24 June 1997. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* *70*, 1–492.
- IARC, I.A. for R. on C. (2002). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In *The Monographs*, pp. 171–300.
- Iarovaia, O.V., Rubtsov, M., Ioudinkova, E., Tsfasman, T., Razin, S.V., and Vassetzky, Y.S. (2014). Dynamics of double strand breaks and chromosomal translocations. *Mol Cancer* *13*, 249.
- Iles, N., Rulten, S., El-Khamisy, S.F., and Caldecott, K.W. (2007). APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks. *Mol Cell Biol* *27*, 3793–3803.
- Imai, K., Nakata, K., Kawai, K., Hamano, T., Mei, N., Kasai, H., and Okamoto, T. (2005). Induction of OGG1 gene expression by HIV-1 Tat. *Journal of Biological Chemistry* *280*, 26701–26713.
- Imai, S., Sugiura, M., Mizuno, F., Ohigashi, H., Koshimizu, K., Chiba, S., and Osato, T. (1994). African Burkitt's lymphoma: a plant, *Euphorbia tirucalli*, reduces Epstein-Barr virus-specific cellular immunity. *Anticancer Res* *14*, 933–936.
- Imbeault, M., Ouellet, M., Giguère, K., Bertin, J., Bélanger, D., Martin, G., and Tremblay, M.J. (2011). Acquisition of host-derived CD40L by HIV-1 in vivo and its functional consequences in the B-cell compartment. *J Virol* *85*, 2189–2200.
- Incrocci, R., McCormack, M., and Swanson-Mungerson, M. (2013). Epstein-Barr virus LMP2A increases IL-10 production in mitogen-stimulated primary B-cells and B-cell lymphomas. *J Gen Virol* *94*, 1127–1133.
- Incrocci, R., Barse, L., Stone, A., Vagvala, S., Montesano, M., Subramaniam, V., and Swanson-Mungerson, M. (2017). Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) enhances IL-10 production through the activation of Bruton's tyrosine kinase and STAT3. *Virology* *500*, 96–102.
- Incrocci, R., McAloon, J., Montesano, M., Bardahl, J., Vagvala, S., Stone, A., and Swanson-Mungerson, M. (2019). Epstein-Barr virus LMP2A utilizes Syk and PI3K to activate NF-κB in B-cell lymphomas to increase MIP-1α production. *J Med Virol* *91*, 845–855.

- International Agency for Research on Cancer (2012). Aflatoxins IARC Monographs. International Agency for Research on Cancer *100F*, 225–248.
- Isaguliant, M., Bayurova, E., Avdoshina, D., Kondrashova, A., Chiodi, F., and Palefsky, J.M. (2021). Oncogenic Effects of HIV-1 Proteins, Mechanisms Behind. *Cancers (Basel)* *13*.
- Isel, C., and Karn, J. (1999). Direct evidence that HIV-1 Tat stimulates RNA polymerase II carboxyl-terminal domain hyperphosphorylation during transcriptional elongation. *J Mol Biol* *290*, 929–941.
- Ishizawa, K. (2019). JSH practical guidelines for hematological malignancies, 2018: II. Lymphoma-6. Burkitt lymphoma (BL). *Int J Hematol* *110*, 265–271.
- Ito, Y., Kawanishi, M., Harayama, T., and Takabayashi, S. (1981). Combined effect of the extracts from *Croton tiglium*, *Euphorbia lathyris* or *Euphorbia tirucalli* and n-butyrate on Epstein-Barr virus expression in human lymphoblastoid P3HR-1 and Raji cells. *Cancer Lett* *12*, 175–180.
- Iwakiri, D., Eizuru, Y., Tokunaga, M., and Takada, K. (2003). Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer Res* *63*, 7062–7067.
- J de Castro, I., and Lusic, M. (2019). Navigating through the nucleus with a virus. *Curr Opin Genet Dev* *55*, 100–105.
- Jackson, D.A., Hassan, A.B., Errington, R.J., and Cook, P.R. (1993). Visualization of focal sites of transcription within human nuclei. *EMBO J* *12*, 1059–1065.
- Jaffe, E.S. (2009). The 2008 WHO classification of lymphomas: implications for clinical practice and translational research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 523–531.
- Jain, R., Roncella, S., Hashimoto, S., Carbone, A., Francia di Celle, P., Foa, R., Ferrarini, M., and Chiorazzi, N. (1994). A potential role for antigen selection in the clonal evolution of Burkitt's lymphoma. *J Immunol* *153*, 45–52.
- Janse van Rensburg, E., van Heerden, W.F., Robson, B.A., Swart, T.J., and Engelbrecht, S. (2000). Epstein-Barr virus strain characterisation in South African patients with nasopharyngeal carcinomas. *Anticancer Res* *20*, 1953–1957.
- Jarboui, M.A., Bidoia, C., Woods, E., Roe, B., Wynne, K., Elia, G., Hall, W.W., and Gautier, V.W. (2012). Nucleolar protein trafficking in response to HIV-1 Tat: rewiring the nucleolus. *PLoS One* *7*, e48702.
- Jayasooriya, S., de Silva, T.I., Njie-jobe, J., Sanyang, C., Leese, A.M., Bell, A.I., McAulay, K.A., Yanchun, P., Long, H.M., Dong, T., et al. (2015). Early Virological and Immunological Events in Asymptomatic Epstein-Barr Virus Infection in African Children. *PLoS Pathog* *11*, e1004746.
- Johnson, T.P., Patel, K., Johnson, K.R., Maric, D., Calabresi, P.A., Hasbun, R., and Nath, A. (2013). Induction of IL-17 and nonclassical T-cell activation by HIV-Tat protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 13588–13593.
- Joncas, J., Boucher, J., Granger-Julien, M., and Filion, C. (1974). Epstein-Barr virus infection in the neonatal period and in childhood. *Can Med Assoc J* *110*, 33–37.
- Kabotyanski, E.B., Gomelsky, L., Han, J.O., Stamato, T.D., and Roth, D.B. (1998). Double-strand break repair in Ku86- and XRCC4-deficient cells. *Nucleic Acids Res* *26*, 5333–5342.
- Kafuko, G.W., and Burkitt, D.P. (1970). Burkitt's lymphoma and malaria. *Int J Cancer* *6*, 1–9.
- Kaiser, C., Laux, G., Eick, D., Jochner, N., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* *73*, 4481–4484.
- Kalchschmidt, J.S., Bashford-Rogers, R., Paschos, K., Gillman, A.C.T., Styles, C.T., Kellam, P., and Allday, M.J. (2016). Epstein-Barr virus nuclear protein EBNA3C directly induces expression of AID and somatic mutations in B cells. *The Journal of Experimental Medicine* *jem.20160120*.
- Kamranvar, S.A., and Masucci, M.G. (2011). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia* *25*, 1017–1025.

- Kamranvar, S.A., Chen, X., and Masucci, M.G. (2013). Telomere dysfunction and activation of alternative lengthening of telomeres in B-lymphocytes infected by Epstein-Barr virus. *Oncogene* 32, 5522–5530.
- Kandathil, A.J., Sugawara, S., and Balagopal, A. (2016). Are T cells the only HIV-1 reservoir? *Retrovirology* 13, 86.
- Karran, L., Gao, Y., Smith, P.R., and Griffin, B.E. (1992). Expression of a family of complementary-strand transcripts in Epstein-Barr virus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 8058–8062.
- Karrer, U., and Nadal, D. (2014). Virus d'Epstein-Barr et mononucléose infectieuse. *Forum Med Suisse* 14.
- Kashuba, E., Mattsson, K., Pokrovskaja, K., Kiss, C., Protopopova, M., Ehlin-Henriksson, B., Klein, G., and Szekely, L. (2003). EBV-encoded EBNA-5 associates with P14ARF in extranucleolar inclusions and prolongs the survival of P14ARF-expressing cells. *Int J Cancer* 105, 644–653.
- Kashuba, E., Yurchenko, M., Yenamandra, S.P., Snopok, B., Szekely, L., Bercovich, B., Ciechanover, A., and Klein, G. (2011). Epstein-Barr virus-encoded EBNA-5 forms trimolecular protein complexes with MDM2 and p53 and inhibits the transactivating function of p53. *Int J Cancer* 128, 817–825.
- Kaye, K.M., Devergne, O., Harada, J.N., Izumi, K.M., Yalamanchili, R., Kieff, E., and Mosialos, G. (1996). Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11085–11090.
- Kelly, G.L., and Rickinson, A.B. (2007). Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 277–284.
- Kelly, G., Bell, A., and Rickinson, A. (2002). Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med* 8, 1098–1104.
- Kelly, G.L., Milner, A.E., Tierney, R.J., Croom-Carter, D.S.G., Altmann, M., Hammerschmidt, W., Bell, A.I., and Rickinson, A.B. (2005). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol* 79, 10709–10717.
- Kennedy, G., Komano, J., and Sugden, B. (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14269–14274.
- Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2014). Regulation of the latent-lytic switch in Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* 26, 60–68.
- Kikuta, H., Taguchi, Y., Tomizawa, K., Kojima, K., Kawamura, N., Ishizaka, A., Sakiyama, Y., Matsumoto, S., Imai, S., and Kinoshita, T. (1988). Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* 333, 455–457.
- Kim, V.N., and Nam, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends Genet* 22, 165–173.
- Kim, B.O., Liu, Y., Zhou, B.Y., and He, J.J. (2004). Induction of C chemokine XCL1 (lymphotactin/single C motif-1 alpha/activation-induced, T cell-derived and chemokine-related cytokine) expression by HIV-1 Tat protein. *J Immunol* 172, 1888–1895.
- Kim, C.M., Vogel, J., Jay, G., and Rhim, J.S. (1992). The HIV tat gene transforms human keratinocytes. *Oncogene* 7, 1525–1529.
- Kim, I., Park, E.-R., Park, S.-H., Lin, Z., and Kim, Y.-S. (2002). Characteristics of Epstein-Barr virus isolated from the malignant lymphomas in Korea. *J Med Virol* 67, 59–66.
- Kim, J.H., Kim, W.S., and Park, C. (2013a). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 increases genomic instability through Egr-1-mediated up-regulation of activation-induced cytidine deaminase in B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 54, 2035–2040.
- Kim, J.H., Kim, W.S., Hong, J.Y., Ryu, K.J., Kim, S.J., and Park, C. (2017). Epstein-Barr virus EBNA2 directs doxorubicin resistance of B cell lymphoma through CCL3 and CCL4-mediated activation of NF-κB and Btk. *Oncotarget* 8, 5361–5370.
- Kim, N., Kukkonen, S., Martinez-Viedma, M.D.P., Gupta, S., and Aldovini, A. (2013b). Tat engagement of p38 MAP kinase and IRF7 pathways leads to activation of interferon-stimulated genes in antigen-presenting cells. *Blood* 121, 4090–4100.
- Kirchhoff, F. (2013). HIV Life Cycle: Overview. In *Encyclopedia of AIDS*, T.J. Hope, M. Stevenson, and D. Richman, eds. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–9.

- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., et al. (2000). Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J* 19, 6742–6750.
- Klein, G. (1979). Lymphoma development in mice and humans: diversity of initiation is followed by convergent cytogenetic evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 2442–2446.
- Klumb, C.E., Hassan, R., De Oliveira, D.E., De Resende, L.M.M., Carriço, M.K., De Almeida Dobbin, J., Pombo-De-Oliveira, M.S., Bacchi, C.E., and Maia, R.C. (2004). Geographic variation in Epstein-Barr virus-associated Burkitt's lymphoma in children from Brazil. *Int J Cancer* 108, 66–70.
- Knowles, D.M. (2003). Etiology and pathogenesis of AIDS-related non-Hodgkin's lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 17, 785–820.
- Ko, H.L., and Ren, E.C. (2012). Functional Aspects of PARP1 in DNA Repair and Transcription. *Biomolecules* 2, 524–548.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73, 9827–9831.
- Korać, P., Dotlić, S., Matulić, M., Zajc Petranović, M., and Dominis, M. (2017). Role of MYC in B Cell Lymphomagenesis. *Genes (Basel)* 8.
- Kosak, S.T., Skok, J.A., Medina, K.L., Riblet, R., Le Beau, M.M., Fisher, A.G., and Singh, H. (2002). Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development. *Science* 296, 158–162.
- Krawczyk, P.M., Borovski, T., Stap, J., Cijssouw, T., ten Cate, R., Medema, J.P., Kanaar, R., Franken, N. a. P., and Aten, J.A. (2012). Chromatin mobility is increased at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Sci* 125, 2127–2133.
- Kruhlak, M.J., Celeste, A., Dellaire, G., Fernandez-Capetillo, O., Müller, W.G., McNally, J.G., Bazett-Jones, D.P., and Nussenzweig, A. (2006). Changes in chromatin structure and mobility in living cells at sites of DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 172, 823–834.
- Kulashreshtha, M., Mehta, I.S., Kumar, P., and Rao, B.J. (2016). Chromosome territory relocation during DNA repair requires nuclear myosin 1 recruitment to chromatin mediated by γ -H2AX signaling. *Nucleic Acids Res* 44, 8272–8291.
- Kundu, R.K., Sangiorgi, F., Wu, L.Y., Pattengale, P.K., Hinton, D.R., Gill, P.S., and Maxson, R. (1999). Expression of the human immunodeficiency virus-Tat gene in lymphoid tissues of transgenic mice is associated with B-cell lymphoma. *Blood* 94, 275–282.
- Kunimoto, M., Tamura, S., Tabata, T., and Yoshie, O. (1992). One-step typing of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction: predominance of type 1 virus in Japan. *J Gen Virol* 73 (Pt 2), 455–461.
- Kuo, L.J., and Yang, L.-X. (2008). Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo (Athens, Greece)* 22, 305–309.
- Küppers, R. (2005). Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nature Reviews. Cancer* 5, 251–262.
- Küppers, R., and Dalla-Favera, R. (2001). Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580–5594.
- Kurnaeva, M.A., Sheval, E.V., Musinova, Y.R., and Vassetzky, Y.S. (2019). Tat basic domain: A “Swiss army knife” of HIV-1 Tat? *Rev Med Virol* 29, e2031.
- Kuroda, M., Tanabe, H., Yoshida, K., Oikawa, K., Saito, A., Kiyuna, T., Mizusawa, H., and Mukai, K. (2004). Alteration of chromosome positioning during adipocyte differentiation. *J Cell Sci* 117, 5897–5903.
- Kutok, J.L., and Wang, F. (2006). SPECTRUM OF EPSTEIN-BARR VIRUS-ASSOCIATED DISEASES. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 1, 375–404.
- Kuzembayeva, M., Hayes, M., and Sugden, B. (2014). Multiple functions are mediated by the miRNAs of Epstein-Barr virus. *Curr Opin Virol* 7, 61–65.
- Kyaw, M.T., Hurren, L., Evans, L., Moss, D.J., Cooper, D.A., Benson, E., Esmore, D., and Sculley, T.B. (1992). Expression of B-type Epstein-Barr virus in HIV-infected patients and cardiac transplant recipients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 8, 1869–1874.

- 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.
- Lallemant-Breitenbach, V., and de Thé, H. (2010). PML nuclear bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*, a000661.
- Larochelle, B., Flamand, L., Gourde, P., Beauchamp, D., and Gosselin, J. (1998). Epstein-Barr virus infects and induces apoptosis in human neutrophils. *Blood* *92*, 291–299.
- Lauer, J.M., Duggan, C.P., Ausman, L.M., Griffiths, J.K., Webb, P., Wang, J.-S., Xue, K.S., Agaba, E., Nshakira, N., and Ghosh, S. (2019). Maternal aflatoxin exposure during pregnancy and adverse birth outcomes in Uganda. *Matern Child Nutr* *15*, e12701.
- Laurence, J., and Astrin, S.M. (1991). Human immunodeficiency virus induction of malignant transformation in human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *88*, 7635–7639.
- Lay, M.-L.J., Lucas, R.M., Toi, C., Ratnamohan, M., Ponsonby, A.-L., and Dwyer, D.E. (2012). Epstein-Barr virus genotypes and strains in central nervous system demyelinating disease and Epstein-Barr virus-related illnesses in Australia. *Intervirology* *55*, 372–379.
- Lazzi, S., Bellan, C., De Falco, G., Cinti, C., Ferrari, F., Nyongo, A., Claudio, P.P., Tosi, G.M., Vatti, R., Gloghini, A., et al. (2002). Expression of RB2/p130 tumor-suppressor gene in AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas: implications for disease pathogenesis. *Hum Pathol* *33*, 723–731.
- Lee, J.M., Lee, K.-H., Weidner, M., Osborne, B.A., and Hayward, S.D. (2002). Epstein-Barr virus EBNA2 blocks Nur77- mediated apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *99*, 11878–11883.
- Lee-Theilen, M., Matthews, A.J., Kelly, D., Zheng, S., and Chaudhuri, J. (2011). CtIP promotes microhomology-mediated alternative end joining during class-switch recombination. *Nat Struct Mol Biol* *18*, 75–79.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, M.G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12616–12621.
- Li, C.J., Wang, C., Friedman, D.J., and Pardee, A.B. (1995). Reciprocal modulations between p53 and Tat of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 5461–5464.
- Liang, F., and Jasin, M. (1996). Ku80-deficient cells exhibit excess degradation of extrachromosomal DNA. *J Biol Chem* *271*, 14405–14411.
- Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D.C. (1988). Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet* *80*, 224–234.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* *79*, 181–211.
- Lieber, M.R., Yu, K., and Raghavan, S.C. (2006). Roles of nonhomologous DNA end joining, V(D)J recombination, and class switch recombination in chromosomal translocations. *DNA Repair (Amst)* *5*, 1234–1245.
- Lieberman-Aiden, E., van Berkum, N.L., Williams, L., Imakaev, M., Ragoczy, T., Telling, A., Amit, I., Lajoie, B.R., Sabo, P.J., Dorschner, M.O., et al. (2009). Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome. *Science* *326*, 289–293.
- Lien, K., Mayer, W., Herrera, R., Rosbe, K., and Tugizov, S.M. (2019). HIV-1 proteins gp120 and tat induce the epithelial-mesenchymal transition in oral and genital mucosal epithelial cells. *PLoS One* *14*, e0226343.
- Lin, C., Yang, L., Tanasa, B., Hutt, K., gun Ju, B., Ohgi, K., Zhang, J., Rose, D.W., Fu, X.D., Glass, C.K., et al. (2009). Nuclear Receptor-Induced Chromosomal Proximity and DNA Breaks Underlie Specific Translocations in Cancer. *Cell* *139*, 1069–1083.
- Lin, J.-H., Lin, J.-Y., Chou, Y.-C., Chen, M.-R., Yeh, T.-H., Lin, C.-W., Lin, S.-J., and Tsai, C.-H. (2015). Epstein-Barr virus LMP2A suppresses MHC class II expression by regulating the B-cell transcription factors E47 and PU.1. *Blood* *125*, 2228–2238.
- Lindhout, E., Lakeman, A., Mevissen, M.L., and de Groot, C. (1994). Functionally active Epstein-Barr virus-transformed follicular dendritic cell-like cell lines. *J Exp Med* *179*, 1173–1184.

- Lindström, M.S., and Wiman, K.G. (2002). Role of genetic and epigenetic changes in Burkitt lymphoma. *Semin Cancer Biol* 12, 381–387.
- Linke-Serinsöz, E., Fend, F., and Quintanilla-Martinez, L. (2017). Human immunodeficiency virus (HIV) and Epstein-Barr virus (EBV) related lymphomas, pathology view point. *Semin Diagn Pathol* 34, 352–363.
- Liu, J., Zhang, Z., Bando, M., Itoh, T., Deardorff, M.A., Clark, D., Kaur, M., Tandy, S., Kondoh, T., Rappaport, E., et al. (2009). Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells. *PLoS Biol* 7, e1000119.
- Liu, M., Duke, J.L., Richter, D.J., Vinuesa, C.G., Goodnow, C.C., Kleinstein, S.H., and Schatz, D.G. (2008). Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841–845.
- Liu, Y., Liu, H., Kim, B.O., Gattone, V.H., Li, J., Nath, A., Blum, J., and He, J.J. (2004). CD4-Independent Infection of Astrocytes by Human Immunodeficiency Virus Type 1: Requirement for the Human Mannose Receptor. *JVI* 78, 4120–4133.
- Liu, Y.-P., Chen, C.-H., Yen, C.-H., Tung, C.-W., Chen, C.-J., Chen, Y.-M.A., and Huang, M.-S. (2018). Human immunodeficiency virus Tat-TIP30 interaction promotes metastasis by enhancing the nuclear translocation of Snail in lung cancer cell lines. *Cancer Sci* 109, 3105–3114.
- Lu, J., Murakami, M., Verma, S.C., Cai, Q., Haldar, S., Kaul, R., Wasik, M.A., Middeldorp, J., and Robertson, E.S. (2011). Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology* 410, 64–75.
- Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251–260.
- Lurain, K., Yarchoan, R., and Ramaswami, R. (2019). The Changing Face of HIV-Associated Malignancies: Advances, Opportunities, and Future Directions. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 39, 36–40.
- MacNeil, A., Sumba, O.P., Lutzke, M.L., Moormann, A., and Rochford, R. (2003). Activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle by the latex of the plant *Euphorbia tirucalli*. *Br J Cancer* 88, 1566–1569.
- Magrath, I. (2012). Epidemiology: clues to the pathogenesis of Burkitt lymphoma: Review. *British Journal of Haematology* 156, 744–756.
- Maguire, O., Wallace, P.K., and Minderman, H. (2016). Fluorescent in situ hybridization in suspension by imaging flow cytometry. *Methods in Molecular Biology* 1389, 111–126.
- Mahmoudi, T., Parra, M., Vries, R.G.J., Kauder, S.E., Verrijzer, C.P., Ott, M., and Verdin, E. (2006). The SWI/SNF chromatin-remodeling complex is a cofactor for Tat transactivation of the HIV promoter. *J Biol Chem* 281, 19960–19968.
- Mancao, C., and Hammerschmidt, W. (2007). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110, 3715–3721.
- Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B., and Hammerschmidt, W. (2005). Rescue of “crippled” germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339–4344.
- Mannucci, S., Luzzi, A., Carugi, A., Gozzetti, A., Lazzi, S., Malagnino, V., Simmonds, M., Cusi, M.G., Leoncini, L., Van Den Bosch, C.A., et al. (2012a). EBV reactivation and chromosomal polysomies: *Euphorbia tirucalli* as a possible cofactor in endemic Burkitt lymphoma. *Advances in Hematology*.
- Mannucci, S., Luzzi, A., Carugi, A., Gozzetti, A., Lazzi, S., Malagnino, V., Simmonds, M., Cusi, M.G., Leoncini, L., van den Bosch, C.A., et al. (2012b). EBV Reactivation and Chromosomal Polysomies: *Euphorbia tirucalli* as a Possible Cofactor in Endemic Burkitt Lymphoma. *Advances in Hematology* 2012, 1–11.
- Marcello, A., Zoppé, M., and Giacca, M. (2001). Multiple modes of transcriptional regulation by the HIV-1 Tat transactivator. *IUBMB Life* 51, 175–181.
- Marchese, S., Polo, A., Ariano, A., Velotto, S., Costantini, S., and Severino, L. (2018). Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development.
- Marelle, L., Rea, D., and Raphaël, M. (1993). Le virus d’Epstein-Barr et les proliférations lymphoïdes. *médecine/sciences* 9, 693–700.

- Markozashvili, D., Pichugin, A., Barat, A., Camara-Clayette, V., Vasilyeva, N.V., Lelièvre, H., Kraus-Berthier, L., Depil, S., Ribrag, V., and Vassetzky, Y. (2016). Histone deacetylase inhibitor abexinostat affects chromatin organization and gene transcription in normal B cells and in mantle cell lymphoma. *Gene*.
- Marquitz, A.R., Mathur, A., Edwards, R.H., and Raab-Traub, N. (2015). Host Gene Expression Is Regulated by Two Types of Noncoding RNAs Transcribed from the Epstein-Barr Virus BamHI A Rightward Transcript Region. *J Virol* *89*, 11256–11268.
- de Martel, C., Shiels, M.S., Franceschi, S., Simard, E.P., Vignat, J., Hall, H.I., Engels, E.A., and Plummer, M. (2015). Cancers attributable to infections among adults with HIV in the United States. *AIDS* *29*, 2173–2181.
- Martin, G., Roy, J., Barat, C., Ouellet, M., Gilbert, C., and Tremblay, M.J. (2007). Human immunodeficiency virus type 1-associated CD40 ligand transactivates B lymphocytes and promotes infection of CD4+ T cells. *J Virol* *81*, 5872–5881.
- Martorelli, D., Muraro, E., Mastorci, K., Dal Col, J., Faè, D.A., Furlan, C., Giagulli, C., Caccuri, F., Rusnati, M., Fiorentini, S., et al. (2015). A natural HIV p17 protein variant up-regulates the LMP-1 EBV oncoprotein and promotes the growth of EBV-infected B-lymphocytes: implications for EBV-driven lymphomagenesis in the HIV setting. *Int J Cancer* *137*, 1374–1385.
- Maruo, S., Zhao, B., Johannsen, E., Kieff, E., Zou, J., and Takada, K. (2011). Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16INK4A and p14ARF expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 1919–1924.
- Masani, S., Han, L., Meek, K., and Yu, K. (2016). Redundant function of DNA ligase 1 and 3 in alternative end-joining during immunoglobulin class switch recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 1261–1266.
- Matkarimov, B.T., Zharkov, D.O., and Saparbaev, M.K. (2020). Mechanistic insight into the role of Poly(ADP-ribosyl)ation in DNA topology modulation and response to DNA damage. *Mutagenesis* *35*, 107–118.
- Matsumoto, Y., Marusawa, H., Kinoshita, K., Endo, Y., Kou, T., Morisawa, T., Azuma, T., Okazaki, I.-M., Honjo, T., and Chiba, T. (2007). *Helicobacter pylori* infection triggers aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in gastric epithelium. *Nat Med* *13*, 470–476.
- Mawson, A.R., and Majumdar, S. (2017a). Malaria, Epstein-Barr virus infection, and the Pathogenesis of Burkitt's Lymphoma. *International Journal of Cancer*.
- Mawson, A.R., and Majumdar, S. (2017b). Malaria, Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* *141*, 1849–1855.
- McDonald, C., Karstegl, C.E., Kellam, P., and Farrell, P.J. (2010). Regulation of the Epstein-Barr virus Zp promoter in B lymphocytes during reactivation from latency. *J Gen Virol* *91*, 622–629.
- McHugh, D., Myburgh, R., Caduff, N., Spohn, M., Kok, Y.L., Keller, C.W., Murer, A., Chatterjee, B., Rühl, J., Engelmann, C., et al. (2020). EBV renders B cells susceptible to HIV-1 in humanized mice. *Life Sci. Alliance* *3*, e202000640.
- Mdletshe, N., Nel, A., Shires, K., and Mowla, S. (2020). HIV Nef enhances the expression of oncogenic c-MYC and activation-induced cytidine deaminase in Burkitt lymphoma cells promoting genimic instability. *Infectious Agents and Cancer* *15*:54.
- Meaburn, K.J., Misteli, T., and Soutoglou, E. (2007). Spatial genome organization in the formation of chromosomal translocations. *Semin Cancer Biol* *17*, 80–90.
- Mediouni, S., Darque, A., Baillat, G., Ravaux, I., Dhiver, C., Tissot-Dupont, H., Mokhtari, M., Moreau, H., Tamalet, C., Brunet, C., et al. (2012). Antiretroviral Therapy Does Not Block the Secretion of the Human Immunodeficiency Virus Tat Protein. *Infectious Disorders – Drug Targets* *12*, 81–86.
- Mehta, I.S., Amira, M., Harvey, A.J., and Bridger, J.M. (2010). Rapid chromosome territory relocation by nuclear motor activity in response to serum removal in primary human fibroblasts. *Genome Biol* *11*, R5.
- Mehta, I.S., Eski, C.H., Arican, H.D., Kill, I.R., and Bridger, J.M. (2011). Farnesyltransferase inhibitor treatment restores chromosome territory positions and active chromosome dynamics in Hutchinson-Gilford progeria syndrome cells. *Genome Biol* *12*, R74.
- Mehta, I.S., Kulashreshtha, M., Chakraborty, S., Kolthur-Seetharam, U., and Rao, B.J. (2013). Chromosome territories reposition during DNA damage-repair response. *Genome Biol* *14*, R135.

- Mele, A.R., Marino, J., Chen, K., Pirrone, V., Janetopoulos, C., Wigdahl, B., Klase, Z., and Nonnemacher, M.R. (2018). Defining the molecular mechanisms of HIV-1 Tat secretion: PtdIns(4,5)P₂ at the epicenter. *Traffic* **19**, 655–665.
- Methot, S.P., and Di Noia, J.M. (2017). Molecular Mechanisms of Somatic Hypermutation and Class Switch Recombination. *Adv Immunol* **133**, 37–87.
- Milani, D., Zauli, G., Neri, L.M., Marchisio, M., Previati, M., and Capitani, S. (1993). Influence of the human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on the proliferation and differentiation of PC12 rat pheochromocytoma cells. *J Gen Virol* **74** (Pt 12), 2587–2594.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., and Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**, 383–387.
- Miné-Hattab, J., and Chiolo, I. (2020). Complex Chromatin Motions for DNA Repair. *Front Genet* **11**, 800.
- Miné-Hattab, J., and Rothstein, R. (2012). Increased chromosome mobility facilitates homology search during recombination. *Nat Cell Biol* **14**, 510–517.
- Misteli, T. (2010). Higher-order genome organization in human disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000794.
- Mitsuyasu, R.T. (2014). Non-AIDS-defining cancers. *Top Antivir Med* **22**, 660–665.
- Mizuno, F., Koizumi, S., Osato, T., Kokwaro, J.O., and Ito, Y. (1983). Chinese and African Euphorbiaceae plant extracts: Markedly enhancing effect on Epstein-Barr virus-induced transformation. *Cancer Letters* **19**, 199–205.
- Mizuno, F., Osato, T., Imai, S., Koizumi, S., Aya, T., Kinoshita, T., Hirai, N., Hirota, M., Ohigashi, H., and Koshimizu, K. (1986). Epstein-Barr virus-enhancing plant promoters in east Africa. *AIDS Res* **2 Suppl 1**, S151-155.
- Moir, S., Lapointe, R., Malaspina, A., Ostrowski, M., Cole, C.E., Chun, T.-W., Adelsberger, J., Baseler, M., Hwu, P., and Fauci, A.S. (1999). CD40-Mediated Induction of CD4 and CXCR4 on B Lymphocytes Correlates with Restricted Susceptibility to Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection: Potential Role of B Lymphocytes as a Viral Reservoir. *J. Virol.* **73**, 7972–7980.
- Moir, S., Chun, T.-W., and Fauci, A.S. (2011). Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol* **6**, 223–248.
- Molyneux, E.M., Rochford, R., Griffin, B., Newton, R., Jackson, G., Menon, G., Harrison, C.J., Israels, T., and Bailey, S. (2012). Burkitt's lymphoma. *Lancet* **379**, 1234–1244.
- Moormann, A.M., and Bailey, J.A. (2016). Malaria — how this parasitic infection aids and abets EBV-associated Burkitt lymphomagenesis. *Current Opinion in Virology* **20**, 78–84.
- Moquin, S.A., Thomas, S., Whalen, S., Warburton, A., Fernandez, S.G., McBride, A.A., Pollard, K.S., and Miranda, J.L. (2018). The Epstein-Barr Virus Episome Maneuvers between Nuclear Chromatin Compartments during Reactivation. *J. Virol.* **92**.
- Morales-Sánchez, A., and Fuentes-Panana, E. (2018). The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis. *Cancers* **10**, 98.
- Münz, C. (2019). Latency and lytic replication in Epstein-Barr virus-associated oncogenesis.
- Murata, T., and Tsurumi, T. (2014). Switching of EBV cycles between latent and lytic states. *Rev Med Virol* **24**, 142–153.
- Murono, S., Inoue, H., Tanabe, T., Joab, I., Yoshizaki, T., Furukawa, M., and Pagano, J.S. (2001). Induction of cyclooxygenase-2 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is involved in vascular endothelial growth factor production in nasopharyngeal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 6905–6910.
- Musinova, Y.R., Sheval, E.V., Dib, C., Germini, D., and Vassetzky, Y.S. (2016). Functional roles of HIV-1 Tat protein in the nucleus. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 589–601.
- Mutalima, N., Molyneux, E., Jaffe, H., Kamiza, S., Borgstein, E., Mkandawire, N., Liomba, G., Batumba, M., Lagos, D., Gratrix, F., et al. (2008). Associations between Burkitt lymphoma among children in Malawi and infection with HIV, EBV and malaria: Results from a case-control study. *PLoS ONE* **3**.
- Myler, L.R., Gallardo, I.F., Soniat, M.M., Deshpande, R.A., Gonzalez, X.B., Kim, Y., Paull, T.T., and Finkelstein, I.J. (2017). Single-Molecule Imaging Reveals How Mre11-Rad50-Nbs1 Initiates DNA Break Repair. *Mol Cell* **67**, 891-898.e4.

- Nakayama, T., Hieshima, K., Nagakubo, D., Sato, E., Nakayama, M., Kawa, K., and Yoshie, O. (2004). Selective induction of Th2-attracting chemokines CCL17 and CCL22 in human B cells by latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *J Virol* *78*, 1665–1674.
- Nambu, Y., Sugai, M., Gonda, H., Lee, C.-G., Katakai, T., Agata, Y., Yokota, Y., and Shimizu, A. (2003). Transcription-coupled events associating with immunoglobulin switch region chromatin. *Science* *302*, 2137–2140.
- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K., and Takada, K. (2002). Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon- α -induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* *21*, 954–965.
- Neal, J.A., and Meek, K. (2011). Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res* *711*, 73–86.
- Neumaier, T., Swenson, J., Pham, C., Polyzos, A., Lo, A.T., Yang, P., Dyball, J., Asaithamby, A., Chen, D.J., Bissell, M.J., et al. (2012). Evidence for formation of DNA repair centers and dose-response nonlinearity in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *109*, 443–448.
- Neumann, F.R., Dion, V., Gehlen, L.R., Tsai-Pflugfelder, M., Schmid, R., Taddei, A., and Gasser, S.M. (2012). Targeted INO80 enhances subnuclear chromatin movement and ectopic homologous recombination. *Genes and Development* *26*, 369–383.
- Neves, H., Ramos, C., da Silva, M.G., Parreira, A., and Parreira, L. (1999). The nuclear topography of ABL, BCR, PML, and RAR α genes: evidence for gene proximity in specific phases of the cell cycle and stages of hematopoietic differentiation. *Blood* *93*, 1197–1207.
- Neves, M., Marinho-Dias, J., Ribeiro, J., and Sousa, H. (2017). Epstein-Barr virus strains and variations: Geographic or disease-specific variants? *J Med Virol* *89*, 373–387.
- Ng, V.L., and McGrath, M.S. (1998). The immunology of AIDS-associated lymphomas. *Immunol Rev* *162*, 293–298.
- Nguyen, L., Papenhausen, P., and Shao, H. (2017). The Role of c-MYC in B-Cell Lymphomas: Diagnostic and Molecular Aspects. *Genes (Basel)* *8*.
- 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.
- Nick McElhinny, S.A., Havener, J.M., Garcia-Diaz, M., Juárez, R., Bebenek, K., Kee, B.L., Blanco, L., Kunkel, T.A., and Ramsden, D.A. (2005). A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* *19*, 357–366.
- Nijland, M., Kersten, M.J., Pals, S., Bemelman, F., and ten Berge, I. (2016). Epstein-Barr Virus-Positive Posttransplant Lymphoproliferative Disease After Solid Organ Transplantation: Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Management. *Transplantation Direct* *2*, e48.
- Nikiforova, M.N., Stringer, J.R., Blough, R., Medvedovic, M., Fagin, J.A., and Nikiforov, Y.E. (2000). Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells. *Science* *290*, 138–141.
- Niller, H.H., Banati, F., Salamon, D., and Minarovits, J. (2016). Epigenetic Alterations in Epstein-Barr Virus-Associated Diseases. *Adv Exp Med Biol* *879*, 39–69.
- Nilsson, J.A., and Cleveland, J.L. (2003). Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* *22*, 9007–9021.
- Nonaka, T., Toda, Y., Hiai, H., Uemura, M., Nakamura, M., Yamamoto, N., Asato, R., Hattori, Y., Bessho, K., Minato, N., et al. (2016). Involvement of activation-induced cytidine deaminase in skin cancer development. *J Clin Invest* *126*, 1367–1382.
- Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell* *131*, 223–225.
- Ochi, T., Blackford, A.N., Coates, J., Jhujh, S., Mehmood, S., Tamura, N., Travers, J., Wu, Q., Draviam, V.M., Robinson, C.V., et al. (2015). DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair. *Science* *347*, 185–188.
- Ohmori, H., and Hikida, M. (1998). Expression and function of recombination activating genes in mature B cells. *Crit Rev Immunol* *18*, 221–235.

- Ohtani, N., Brennan, P., Gaubatz, S., Sanij, E., Hertzog, P., Wolvetang, E., Ghysdael, J., Rowe, M., and Hara, E. (2003). Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol* 162, 173–183.
- Orem, J., Mbidde, E.K., Lambert, B., de Sanjose, S., and Weiderpass, E. (2007). Burkitt's lymphoma in Africa, a review of the epidemiology and etiology. *Afr Health Sci* 7, 166–175.
- Orsolich, I., Jurada, D., Pullen, N., Oren, M., Eliopoulos, A.G., and Volarevic, S. (2016). The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. *Semin Cancer Biol* 37–38, 36–50.
- Osato, T., Mizuno, F., Imai, S., Aya, T., Koizumi, S., Kinoshita, T., Tokuda, H., Ito, Y., Hirai, N., and Hirota, M. (1987). African Burkitt's lymphoma and an Epstein-Barr virus-enhancing plant *Euphorbia tirucalli*. *Lancet* 7, 1257–1258.
- Osato, T., Imai, S., Kinoshita, T., Aya, T., Sugiura, M., Koizumi, S., and Mizuno, F. (1990). Epstein-Barr virus, Burkitt's lymphoma, and an African tumor promoter. *Adv Exp Med Biol* 278, 147–150.
- Osborne, C.S., Chakalova, L., Mitchell, J.A., Horton, A., Wood, A.L., Bolland, D.J., Corcoran, A.E., and Fraser, P. (2007). Myc dynamically and preferentially relocates to a transcription factory occupied by Igh. *PLoS Biol* 5, e192.
- Öz, R., Howard, S.M., Sharma, R., Törnkvist, H., Ceppi, I., Kk, S., Kristiansson, E., Cejka, P., and Westerlund, F. (2020). Phosphorylated CtIP bridges DNA to promote annealing of broken ends. *Proc Natl Acad Sci USA* 117, 21403–21412.
- Pajic, A., Staeger, M.S., Dudziak, D., Schuhmacher, M., Spitkovsky, D., Eissner, G., Brielmeier, M., Polack, A., and Bornkamm, G.W. (2001). Antagonistic effects of c-myc and Epstein-Barr virus latent genes on the phenotype of human B cells. *Int J Cancer* 93, 810–816.
- Palma, I., Sánchez, A.E., Jiménez-Hernández, E., Alvarez-Rodríguez, F., Nava-Frias, M., Valencia-Mayoral, P., Salinas-Lara, C., Velazquez-Guadarrama, N., Portilla-Aguilar, J., Pena, R.Y., et al. (2013). Detection of Epstein-Barr Virus and Genotyping Based on EBNA2 Protein in Mexican Patients With Hodgkin Lymphoma: A Comparative Study in Children and Adults. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 13, 266–272.
- Palser, A.L., Grayson, N.E., White, R.E., Corton, C., Correia, S., Ba abdullah, M.M., Watson, S.J., Cotten, M., Arrand, J.R., Murray, P.G., et al. (2015). Genome Diversity of Epstein-Barr Virus from Multiple Tumor Types and Normal Infection. *J. Virol.* 89, 5222–5237.
- Parada, C.A., and Roeder, R.G. (1996). Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature* 384, 375–378.
- Parada, L.A., and Misteli, T. (2002). Chromosome positioning in the interphase nucleus.
- Parada, L.A., McQueen, P.G., and Misteli, T. (2004). Tissue-specific spatial organization of genomes. *5*.
- Parker, B.D., Bankier, A., Satchwell, S., Barrell, B., and Farrell, P.J. (1990). Sequence and transcription of Raji Epstein-Barr virus DNA spanning the B95-8 deletion region. *Virology* 179, 339–346.
- Parroche, P., Lauw, F.N., Goutagny, N., Latz, E., Monks, B.G., Visintin, A., Halmen, K.A., Lamphier, M., Olivier, M., Bartholomeu, D.C., et al. (2007). Malaria hemozoin is immunologically inert but radically enhances innate responses by presenting malaria DNA to Toll-like receptor 9. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1919–1924.
- Pascal, J.M. (2018). The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)* 71, 177–182.
- Passarelli, S., Bromage, S., Darling, A.M., Wang, J.-S., Aboud, S., Mugusi, F., Griffiths, J.K., and Fawzi, W. (2020). Aflatoxin exposure in utero and birth and growth outcomes in Tanzania. *Matern Child Nutr* 16, e12917.
- Pauklin, S., Sernández, I.V., Bachmann, G., Ramiro, A.R., and Petersen-Mahrt, S.K. (2009). Estrogen directly activates AID transcription and function. *J Exp Med* 206, 99–111.
- Pavri, R., Gazumyan, A., Jankovic, M., Di Virgilio, M., Klein, I., Ansarah-Sobrinho, C., Resch, W., Yamane, A., Reina San-Martin, B., Barreto, V., et al. (2010). Activation-induced cytidine deaminase targets DNA at sites of RNA polymerase II stalling by interaction with Spt5. *Cell* 143, 122–133.
- Peeters, M., D'Arc, M., and Delaporte, E. (2014). Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev* 16, 23–34.

- Pegman, P.M., Smith, S.M., D'Souza, B.N., Loughran, S.T., Maier, S., Kempkes, B., Cahill, P.A., Simmons, M.J., Gélinas, C., and Walls, D. (2006). Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 trans-activates the cellular antiapoptotic bfl-1 gene by a CBF1/RBPJ kappa-dependent pathway. *J Virol* *80*, 8133–8144.
- Pelicci, P.G., Knowles, D.M., Magrath, I., and Dalla-Favera, R. (1986). Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* *83*, 2984–2988.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grässer, F.A., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., John, B., Enright, A.J., Marks, D., Sander, C., et al. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* *304*, 734–736.
- Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* *137*, 1194–1211.
- Phillips, A.N., Neaton, J., and Lundgren, J.D. (2008). The role of HIV in serious diseases other than AIDS. *Aids* *22*, 2409–2418.
- Pilch, D.R., Sedelnikova, O.A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., and Bonner, W.M. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* *81*, 123–129.
- Piriou, E., Kimmel, R., Chelimo, K., Middeldorp, J.M., Odada, P.S., Ploutz-Snyder, R., Moormann, A.M., and Rochford, R. (2009). Serological evidence for long-term Epstein-Barr virus reactivation in children living in a holoendemic malaria region of Kenya. *J Med Virol* *81*, 1088–1093.
- Polack, A., Hörtnagel, K., Pajic, A., Christoph, B., Baier, B., Falk, M., Mautner, J., Geltinger, C., Bornkamm, G.W., and Kempkes, B. (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 10411–10416.
- Portela, A., and Esteller, M. (2010). Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol* *28*, 1057–1068.
- 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.
- Potup, P., Kumsiri, R., Kano, S., Kalambaheti, T., Looareesuwan, S., Troye-Blomberg, M., and Maneerat, Y. (2009). Blood stage Plasmodium falciparum antigens induce immunoglobulin class switching in human enriched B cell culture. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* *40*, 651–664.
- Poulin, L., Paquettet, N., Moir, S., Lapointe, R., and Darveau, A. (1994). Productive infection of normal CD40-activated human B lymphocytes by HIV-1: *AIDS* *8*, 1539–1544.
- Preisler, V. (2000). Aflatoxin B1-induced mitotic recombination in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis* *15*, 91–97.
- Raab-Traub, N., Dambaugh, T., and Kieff, E. (1980). DNA of Epstein-Barr virus VIII: B95-8, the previous prototype, is an unusual deletion derivative. *Cell* *22*, 257–267.
- Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology* *27*, 230–240.
- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. (1982). Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* *44*, 834–844.
- Ragoczy, T., Bender, M.A., Telling, A., Byron, R., and Groudine, M. (2006). The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation. *Genes Dev* *20*, 1447–1457.
- Rainey, J.J., Mwanda, W.O., Wairimu, P., Moormann, A.M., Wilson, M.L., and Rochford, R. (2007). Spatial distribution of Burkitt's lymphoma in Kenya and association with malaria risk. *Trop Med Int Health* *12*, 936–943.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Eisenreich, T., Difilippantonio, S., Chen-Kiang, S., Muramatsu, M., Honjo, T., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2004). AID is required for c-myc/IgH chromosome translocations in vivo. *Cell* *118*, 431–438.
- Ramiro, A.R., Jankovic, M., Callen, E., Difilippantonio, S., Chen, H.-T., McBride, K.M., Eisenreich, T.R., Chen, J., Dickins, R.A., Lowe, S.W., et al. (2006). Role of genomic instability and p53 in AID-induced c-myc-IgH translocations. *Nature* *440*, 105–109.
- Ramsden, D.A. (2011). Polymerases in nonhomologous end joining: building a bridge over broken chromosomes. *Antioxid Redox Signal* *14*, 2509–2519.

- Ray Chaudhuri, A., and Nussenzweig, A. (2017). The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 18, 610–621.
- Reddy, K.L., Zullo, J.M., Bertolino, E., and Singh, H. (2008). Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature* 452, 243–247.
- Reeder, J.E., Kwak, Y.-T., McNamara, R.P., Forst, C.V., and D’Orso, I. (2015). HIV Tat controls RNA Polymerase II and the epigenetic landscape to transcriptionally reprogram target immune cells. *ELife* 4, e08955.
- Reusch, J.A., Nawandar, D.M., Wright, K.L., Kenney, S.C., and Mertz, J.E. (2015). Cellular differentiation regulator BLIMP1 induces Epstein-Barr virus lytic reactivation in epithelial and B cells by activating transcription from both the R and Z promoters. *J Virol* 89, 1731–1743.
- Revoltella, R.P., Vigneti, E., Fruscalzo, A., Park, M., Ragona, G., Rocchi, G., and Calef, E. (1989). Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J Gen Virol* 70 (Pt 5), 1203–1215.
- Ribrag, V., and Bosq, J. (2013). Lymphomes de Burkitt. *EMC - Hématologie* 1, 1–9.
- Richter, J., Schlesner, M., Hoffmann, S., Kreuz, M., Leich, E., Burkhardt, B., Rosolowski, M., Ammerpohl, O., Wagener, R., Bernhart, S.H., et al. (2012). Recurrent mutation of the ID3 gene in Burkitt lymphoma identified by integrated genome, exome and transcriptome sequencing. *Nat Genet* 44, 1316–1320.
- Rickabaugh, T.M., Kilpatrick, R.D., Hultin, L.E., Hultin, P.M., Hausner, M.A., Sugar, C.A., Althoff, K.N., Margolick, J.B., Rinaldo, C.R., Detels, R., et al. (2011). The dual impact of HIV-1 infection and aging on naïve CD4 T-cells: additive and distinct patterns of impairment. *PLoS One* 6, e16459.
- Rieder, D., Trajanoski, Z., and McNally, J.G. (2012). Transcription factories. *Front Genet* 3, 221.
- Robbiani, D.F., and Nussenzweig, M.C. (2013). Chromosome Translocation, B Cell Lymphoma, and Activation-Induced Cytidine Deaminase. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 8, 79–103.
- Robbiani, D.F., Bothmer, A., Callen, E., Reina-San-Martin, B., Dorsett, Y., Difilippantonio, S., Bolland, D.J., Chen, H.T., Corcoran, A.E., Nussenzweig, A., et al. (2008). AID is required for the chromosomal breaks in c-myc that lead to c-myc/IgH translocations. *Cell* 135, 1028–1038.
- Robbiani, D.F., Bunting, S., Feldhahn, N., Bothmer, A., Camps, J., Deroubaix, S., McBride, K.M., Klein, I.A., Stone, G., Eisenreich, T.R., et al. (2009). AID Produces DNA Double-Strand Breaks in Non-Ig Genes and Mature B Cell Lymphomas with Reciprocal Chromosome Translocations. *Molecular Cell* 36, 631–641.
- Robertson, E.S., Tomkinson, B., and Kieff, E. (1994). An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J Virol* 68, 1449–1458.
- Roccato, E., Bressan, P., Sabatella, G., Rumio, C., Vizzotto, L., Pierotti, M.A., and Greco, A. (2005). Proximity of TPR and NTRK1 rearranging loci in human thyrocytes. *Cancer Res* 65, 2572–2576.
- Rocha, P.P., Micsinai, M., Kim, J.H.R., Hewitt, S.L., Souza, P.P., Trimarchi, T., Strino, F., Parisi, F., Kluger, Y., and Skok, J.A. (2012). Close Proximity to IgH Is a Contributing Factor to AID-Mediated Translocations. *Molecular Cell*.
- Rochford, R. (2016). Epstein-Barr virus infection of infants: implications of early age of infection on viral control and risk for Burkitt lymphoma. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México* 73, 41–46.
- Rochford, R., and Moormann, A.M. (2015). Burkitt’s Lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 267–285.
- Rochford, R., Cannon, M.J., and Moormann, A.M. (2005). Endemic Burkitt’s lymphoma: a polymicrobial disease? *Nat Rev Microbiol* 3, 182–187.
- Rodriguez-Alfageme, C., Chen, Z., Sonoda, G., Testa, J.R., Damiani, R.D., and Astrin, S.M. (1998). B Cells Malignantly Transformed by Human Immunodeficiency Virus Are Polyclonal. *Virology* 252, 34–38.
- Roix, J.J., McQueen, P.G., Munson, P.J., Parada, L.A., and Misteli, T. (2003). Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas. *Nat Genet* 34, 287–291.

- Romani, B., Engelbrecht, S., and Glashoff, R.H. (2010). Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 91, 1–12.
- Roth, D.B. (2003). Restraining the V(D)J recombinase. *Nat Rev Immunol* 3, 656–666.
- Roughan, J.E., and Thorley-Lawson, D.A. (2009). The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *J Virol* 83, 3968–3976.
- Roukos, V., and Misteli, T. (2014). The biogenesis of chromosome translocations. *Nature Cell Biology* 16, 293–300.
- Roukos, V., Voss, T.C., Schmidt, C.K., Lee, S., Wangsa, D., and Misteli, T. (2013). Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science* 341, 660–664.
- ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G., and Croce, C.M. (1983). Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science* 222, 390–393.
- Rushing, B.R., and Selim, M.I. (2019). Aflatoxin B1: A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods.
- Russell, R.A., Chojnacki, J., Jones, D.M., Johnson, E., Do, T., Eggeling, C., Padilla-Parra, S., and Sattentau, Q.J. (2017). Astrocytes Resist HIV-1 Fusion but Engulf Infected Macrophage Material. *Cell Reports* 18, 1473–1483.
- Ryan, E., Hollingworth, R., and Grand, R. (2016). Activation of the DNA Damage Response by RNA Viruses. *Biomolecules* 6, 2.
- Sadler, R.H., and Raab-Traub, N. (1995). Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* 69, 1132–1141.
- Saha, A., and Robertson, E.S. (2019). Mechanisms of B-Cell Oncogenesis Induced by Epstein-Barr Virus. *Journal of Virology* 93.
- Saha, A., Murakami, M., Kumar, P., Bajaj, B., Sims, K., and Robertson, E.S. (2009). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C augments Mdm2-mediated p53 ubiquitination and degradation by deubiquitinating Mdm2. *J Virol* 83, 4652–4669.
- Said, J., Lones, M., and Yea, S. (2014). Burkitt lymphoma and MYC: what else is new? *Adv Anat Pathol* 21, 160–165.
- Salghetti, S.E., Kim, S.Y., and Tansey, W.P. (1999). Destruction of Myc by ubiquitin-mediated proteolysis: cancer-associated and transforming mutations stabilize Myc. *EMBO J* 18, 717–726.
- Samanta, M., Iwakiri, D., and Takada, K. (2008). Epstein-Barr virus-encoded small RNA induces IL-10 through RIG-I-mediated IRF-3 signaling. *Oncogene* 27, 4150–4160.
- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* 64, 4084–4092.
- Sandvej, K., Peh, S.C., Andresen, B.S., and Pallesen, G. (1994). Identification of potential hot spots in the carboxy-terminal part of the Epstein-Barr virus (EBV) BNLF-1 gene in both malignant and benign EBV-associated diseases: high frequency of a 30-bp deletion in Malaysian and Danish peripheral T-cell lymphomas. *Blood* 84, 4053–4060.
- Santerre, M., Chatila, W., Wang, Y., Mukerjee, R., and Sawaya, B.E. (2019). HIV-1 Nef promotes cell proliferation and microRNA dysregulation in lung cells. *Cell Cycle* 18, 130–142.
- Sardo, L., Vakil, P.R., Elbezanti, W., El-Sayed, A., and Klase, Z. (2016). The inhibition of microRNAs by HIV-1 Tat suppresses beta catenin activity in astrocytes. *Retrovirology* 13, 25.
- Sasai, N., and Defossez, P.-A. (2009). Many paths to one goal? The proteins that recognize methylated DNA in eukaryotes. *Int J Dev Biol* 53, 323–334.
- Savage, J.R. (1993). Interchange and intra-nuclear architecture. *Environ Mol Mutagen* 22, 234–244.
- Savage, J.R. (2000). Cancer. Proximity matters. *Science* 290, 62–63.
- Sawada, A., Inoue, M., and Kawa, K. (2017). How we treat chronic active Epstein-Barr virus infection. *Int J Hematol* 105, 406–418.

- Sawyer, I.A., Sturgill, D., Sung, M.-H., Hager, G.L., and Dundr, M. (2016). Cajal body function in genome organization and transcriptome diversity. *Bioessays* *38*, 1197–1208.
- Sawyer, R.N., Evans, A.S., Niederman, J.C., and McCollum, R.W. (1971). Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis* *123*, 263–270.
- Scala, G., Ruocco, M.R., Ambrosino, C., Mallardo, M., Giordano, V., Baldassarre, F., Dragonetti, E., Quinto, I., and Venuta, S. (1994). The expression of the interleukin 6 gene is induced by the human immunodeficiency virus 1 TAT protein. *J Exp Med* *179*, 961–971.
- Schlee, M., Hölzel, M., Bernard, S., Mailhammer, R., Schuhmacher, M., Reschke, J., Eick, D., Marinkovic, D., Wirth, T., Rosenwald, A., et al. (2007). C-myc activation impairs the NF-kappaB and the interferon response: implications for the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* *120*, 1387–1395.
- Schmitz, R., Ceribelli, M., Pittaluga, S., Wright, G., and Staudt, L.M. (2014). Oncogenic mechanisms in Burkitt lymphoma. *Cold Spring Harb Perspect Med* *4*.
- Schoenfelder, S., Sexton, T., Chakalova, L., Cope, N.F., Horton, A., Andrews, S., Kurukuti, S., Mitchell, J.A., Umlauf, D., Dimitrova, D.S., et al. (2010). Preferential associations between co-regulated genes reveal a transcriptional interactome in erythroid cells. *Nat Genet* *42*, 53–61.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., and Willis, N.A. (2019). DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* *20*, 698–714.
- Secchiero, P., Zella, D., Capitani, S., Gallo, R.C., and Zauli, G. (1999). Extracellular HIV-1 tat protein up-regulates the expression of surface CXCR4-chemokine receptor 4 in resting CD4+ T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* *162*, 2427–2431.
- Seeber, A., Dion, V., and Gasser, S.M. (2013). Checkpoint kinases and the INO80 nucleosome remodeling complex enhance global chromatin mobility in response to DNA damage. *Genes Dev* *27*, 1999–2008.
- Seigneurin, J.-M., Fafi-Kremer, S., Baccard, M., and Morand, P. (2006). Le virus Epstein-Barr et les marqueurs de l'infection.
- Seldam, R.E.J., Cooke, R., and Atkinson, L. (1966). Childhood lymphoma in the territories of Papua and New Guinea. *Cancer* *19*, 437–446.
- Selliah, N., and Finkel, T.H. (2001). Biochemical mechanisms of HIV induced T cell apoptosis. *Cell Death Differ* *8*, 127–136.
- Sergeant, A., Gruffat, H., and Manet, E. (2008). The Epstein-Barr virus (EBV) protein EB is an mRNA export factor essential for virus production. *Front Biosci* *13*, 3798–3813.
- Shanbhag, N.M., Rafalska-Metcalf, I.U., Balane-Bolivar, C., Janicki, S.M., and Greenberg, R.A. (2010). ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* *141*, 970–981.
- Shaw, G.M., and Hunter, E. (2012). HIV transmission. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* *2*, 1–23.
- Sherman, K.E., Peters, M.G., and Thomas, D.L. (2019). HIV and the liver. *Top Antivir Med* *27*, 101–110.
- Shiramizu, B., Barriga, F., Neequaye, J., Jafri, A., Dalla-Favera, R., Neri, A., Gutierrez, M., Levine, P., and Magrath, I. (1991). Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* *77*, 1516–1526.
- Shmakova, A., Germini, D., and Vassetzky, Y. (2020). HIV-1, HAART and cancer: A complex relationship. *Int J Cancer* *146*, 2666–2679.
- Shu, C.H., Chang, Y.S., Liang, C.L., Liu, S.T., Lin, C.Z., and Chang, P. (1992). Distribution of type A and type B EBV in normal individuals and patients with head and neck carcinomas in Taiwan. *J Virol Methods* *38*, 123–130.
- Siemer, D., Kurth, J., Lang, S., Lehnerdt, G., Stanelle, J., and Küppers, R. (2008). EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. *Mol Immunol* *45*, 3133–3141.
- Simon, J.A. (2003). Polycomb group proteins. *Current Biology* *13*, R79–R80.

- Simsek, D., and Jasin, M. (2010). Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat Struct Mol Biol* 17, 410–416.
- Simsek, D., Brunet, E., Wong, S.Y.-W., Katyal, S., Gao, Y., McKinnon, P.J., Lou, J., Zhang, L., Li, J., Rebar, E.J., et al. (2011). DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation. *PLoS Genet* 7, e1002080.
- Siouda, M., Frecha, C., Accardi, R., Yue, J., Cuenin, C., Gruffat, H., Manet, E., Herceg, Z., Sylla, B.S., and Tommasino, M. (2014). Epstein-Barr virus down-regulates tumor suppressor DOK1 expression. *PLoS Pathog* 10, e1004125.
- Sivachandran, N., Dawson, C.W., Young, L.S., Liu, F.-F., Middeldorp, J., and Frappier, L. (2012). Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma. *J Virol* 86, 60–68.
- Sklyar, I., Iarovaia, O.V., Gavrilov, A.A., Pichugin, A., Germini, D., Tsfasman, T., Caron, G., Fest, T., Lipinski, M., Razin, S.V., et al. (2016). Distinct Patterns of Colocalization of the CCND1 and CMYC Genes With Their Potential Translocation Partner IGH at Successive Stages of B-Cell Differentiation. *J Cell Biochem* 117, 1506–1510.
- Smith, M.J., Bryant, E.E., and Rothstein, R. (2018). Increased chromosomal mobility after DNA damage is controlled by interactions between the recombination machinery and the checkpoint. *Genes Dev* 32, 1242–1251.
- Smith, P.R., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, C.E., Griffin, B.E., Karran, L., Wang, Y., Hayward, S.D., and Farrell, P.J. (2000). Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* 74, 3082–3092.
- Snider, C.J., Cole, S.R., Chelimo, K., Sumba, P.O., Macdonald, P.D.M., John, C.C., Meshnick, S.R., and Moormann, A.M. (2012). Recurrent Plasmodium falciparum malaria infections in Kenyan children diminish T-cell immunity to Epstein Barr virus lytic but not latent antigens. *PLoS One* 7, e31753.
- So-Armah, K., Benjamin, L.A., Bloomfield, G.S., Feinstein, M.J., Hsue, P., Njuguna, B., and Freiberg, M.S. (2020). HIV and cardiovascular disease. *Lancet HIV* 7, e279–e293.
- Soulas-Sprauel, P., Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Le Guyader, G., Abramowski, V., Revy, P., and de Villartay, J.-P. (2007). V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26, 7780–7791.
- Spector, D.L. (2001). Nuclear domains. *J Cell Sci* 114, 2891–2893.
- Spehalski, E., Kovalchuk, A.L., Collins, J.T., Liang, G., Dubois, W., Morse, H.C., Ferguson, D.O., Casellas, R., and Dunnick, W.A. (2012). Oncogenic Myc translocations are independent of chromosomal location and orientation of the immunoglobulin heavy chain locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 13728–13732.
- Staeger, M.S., Lee, S.P., Frisan, T., Mautner, J., Scholz, S., Pajic, A., Rickinson, A.B., Masucci, M.G., Polack, A., and Bornkamm, G.W. (2002). MYC overexpression imposes a nonimmunogenic phenotype on Epstein-Barr virus-infected B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 4550–4555.
- Stauber, R.H., and Pavlakis, G.N. (1998). Intracellular trafficking and interactions of the HIV-1 Tat protein. *Virology* 252, 126–136.
- Steel, C.M., Morten, J.E., and Foster, E. (1985). The cytogenetics of human B lymphoid malignancy: studies in Burkitt's lymphoma and Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *IARC Sci Publ* 265–292.
- Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., et al. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462, 1005–1010.
- Stevenson, D., Charalambous, C., and Wilson, J.B. (2005). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (CAO) up-regulates VEGF and TGF alpha concomitant with hyperlasia, with subsequent up-regulation of p16 and MMP9. *Cancer Res* 65, 8826–8835.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45.
- Sullivan, G.J., Bridger, J.M., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Bickmore, W.A., and McStay, B. (2001). Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *EMBO J* 20, 2867–2874.
- Sumba, P.O., Kabiru, E.W., Namuyenga, E., Fiore, N., Otieno, R.O., Moormann, A.M., Orago, A.S., Rosenbaum, P.F., and Rochford, R. (2010). Microgeographic variations in Burkitt's lymphoma incidence correlate with differences in malnutrition, malaria and Epstein-Barr virus. *Br J Cancer* 103, 1736–1741.

- Swanson, P.C. (2004). The bounty of RAGs: recombination signal complexes and reaction outcomes. *Immunol Rev* 200, 90–114.
- Tahirov, T.H., Babayeva, N.D., Varzavand, K., Cooper, J.J., Sedore, S.C., and Price, D.H. (2010). Crystal structure of HIV-1 Tat complexed with human P-TEFb. *Nature* 465, 747–751.
- Takacs, M., Segesdi, J., Banati, F., Koroknai, A., Wolf, H., Niller, H.H., and Minarovits, J. (2009). The importance of epigenetic alterations in the development of Epstein-Barr virus-related lymphomas. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 1, e2009012.
- Takizawa, T., Meaburn, K.J., and Misteli, T. (2008). The meaning of gene positioning. *Cell* 135, 9–13.
- Tao, Q., Robertson, K.D., Manns, A., Hildesheim, A., and Ambinder, R.F. (1998). Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91, 1373–1381.
- Taub, R., Kirsch, I., Morton, C., Lenoir, G., Swan, D., Tronick, S., Aaronson, S., and Leder, P. (1982). Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79, 7837–7841.
- de-The, G. (1977). Is Burkitt's lymphoma related to perinatal infection by Epstein-Barr virus? *Lancet* 1, 335–338.
- de Thé, G. (1997). [Epstein-Barr virus and associated diseases. Course of Medical Virology, Institut Pasteur, 1995/1996]. *Ann Med Interne (Paris)* 148, 357–366.
- de Thé, G., Riviere, M., and Bernhard, W. (1960). Examen au microscope électronique de la tumeur VX2 du lapin domestique dérivée du papillome de Shope. *Bull. Cancer* 570–584.
- de-Thé, G., Geser, A., Day, N.E., Tukei, P.M., Williams, E.H., Beri, D.P., Smith, P.G., Dean, A.G., Bronkamm, G.W., Feorino, P., et al. (1978). Epidemiological evidence for causal relationship between Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma from Ugandan prospective study. *Nature* 274, 756–761.
- Therman, E., Susman, B., and Denniston, C. (1989). The nonrandom participation of human acrocentric chromosomes in Robertsonian translocations. *Ann Hum Genet* 53, 49–65.
- Thijs, A. (1957). [Malignant tumors of Belgium Congo and Ruanda-Urundi natives; 2,536 case reports]. *Ann Soc Belg Med Trop* (1920) 37, 483–484 passim.
- Thorley-Lawson, D.A. (2005). EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 251–261; quiz 262.
- Thorley-Lawson, D.A. (2015). EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390, 151–209.
- Thorley-Lawson, D.A., and Gross, A. (2004). Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350, 1328–1337.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. (1993). Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014–2025.
- Torgbor, C., Awuah, P., Deitsch, K., Kalantari, P., Duca, K.A., and Thorley-Lawson, D.A. (2014). A Multifactorial Role for *P. falciparum* Malaria in Endemic Burkitt's Lymphoma Pathogenesis. *PLoS Pathogens* 10.
- Tozzi, V., Britton, S., Ehrnst, A., Lenkei, R., and Strannegård, Ö. (1989). Persistent productive HIV infection in EBV-transformed B lymphocytes. *J. Med. Virol.* 27, 19–24.
- Tréand, C., du Chéné, I., Brès, V., Kiernan, R., Benarous, R., Benkirane, M., and Emiliani, S. (2006). Requirement for SWI/SNF chromatin-remodeling complex in Tat-mediated activation of the HIV-1 promoter. *EMBO J* 25, 1690–1699.
- Tsai, A.G., Lu, H., Raghavan, S.C., Muschen, M., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2008). Human Chromosomal Translocations at CpG Sites and a Theoretical Basis for Their Lineage and Stage Specificity. *Cell* 135, 1130–1142.
- Tsai, M.-H., Raykova, A., Klink, O., Bernhardt, K., Gärtner, K., Leung, C.S., Geletnek, K., Sertel, S., Münz, C., Feederle, R., et al. (2013). Spontaneous lytic replication and epitheliotropism define an Epstein-Barr virus strain found in carcinomas. *Cell Rep* 5, 458–470.
- Tsurumi, T., Fujita, M., and Kudoh, A. (2005). Latent and lytic Epstein-Barr virus replication strategies. *Rev Med Virol* 15, 3–15.

- Turner, P.C., Collinson, A.C., Cheung, Y.B., Gong, Y., Hall, A.J., Prentice, A.M., and Wild, C.P. (2007). Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *Int J Epidemiol* *36*, 1119–1125.
- Vargas-Ayala, R.C., Jay, A., Manara, F., Maroui, M.A., Hernandez-Vargas, H., Diederichs, A., Robitaille, A., Sirand, C., Ceraolo, M.G., Romero-Medina, M.C., et al. (2019). Interplay between the Epigenetic Enzyme Lysine (K)-Specific Demethylase 2B and Epstein-Barr Virus Infection. *J Virol* *93*.
- Vellutini, C., Horschowski, N., Philippon, V., Gambarelli, D., Nave, K.A., and Filippi, P. (1995). Development of lymphoid hyperplasia in transgenic mice expressing the HIV tat gene. *AIDS Res Hum Retroviruses* *11*, 21–29.
- Vendeville, A., Rayne, F., Bonhoure, A., Bettache, N., Montcourrier, P., and Beaumelle, B. (2004). HIV-1 Tat enters T cells using coated pits before translocating from acidified endosomes and eliciting biological responses. *Molecular Biology of the Cell* *15*, 2347–2360.
- Vendrame, E., Hussain, S.K., Breen, E.C., Magpantay, L.I., Widney, D.P., Jacobson, L.P., Variakojis, D., Knowlton, E.R., Bream, J.H., Ambinder, R.F., et al. (2014). Serum levels of cytokines and biomarkers for inflammation and immune activation, and HIV-associated non-Hodgkin B-cell lymphoma risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* *23*, 343–349.
- Viglianti, G.A., and Mullins, J.I. (1988). Functional comparison of transactivation by simian immunodeficiency virus from rhesus macaques and human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* *62*, 4523–4532.
- Vogel, J., Hinrichs, S.H., Reynolds, R.K., Luciw, P.A., and Jay, G. (1988). The HIV tat gene induces dermal lesions resembling Kaposi's sarcoma in transgenic mice. *Nature* *335*, 606–611.
- Vogel, J., Hinrichs, S.H., Napolitano, L.A., Ngo, L., and Jay, G. (1991). Liver cancer in transgenic mice carrying the human immunodeficiency virus tat gene. *Cancer Res* *51*, 6686–6690.
- Voirin, M.-A. (2017). L'oncogénicité virale : le virus Epstein-Barr, un virus modèle. Université de Lorraine.
- Wakisaka, N., Kondo, S., Yoshizaki, T., Murono, S., Furukawa, M., and Pagano, J.S. (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* *24*, 5223–5234.
- Wang, F., Chen, W., Liu, P., Zhou, J., Liu, B., Ye, W., Wang, W., and Shen, X. (2017). Lentivirus-mediated RNAi knockdown of LMP2A inhibits the growth of the Epstein-Barr-associated gastric carcinoma cell line GT38 in vitro. *Exp Ther Med* *13*, 187–193.
- Wang, J., Shiels, C., Sasieni, P., Wu, P.J., Islam, S.A., Freemont, P.S., and Sheer, D. (2004). Promyelocytic leukemia nuclear bodies associate with transcriptionally active genomic regions. *J Cell Biol* *164*, 515–526.
- Wang, J.H., Gostissa, M., Yan, C.T., Goff, P., Hickernell, T., Hansen, E., Difilippantonio, S., Wesemann, D.R., Zarrin, A.A., Rajewsky, K., et al. (2009). Mechanisms promoting translocations in editing and switching peripheral B cells. *Nature* *460*, 231–236.
- Wang, R., Wang, J., Zhang, N., Wan, Y., Liu, Y., Zhang, L., Pan, S., Zhang, C., Zhang, H., and Cao, Y. (2019). The interaction between Vav1 and EBNA1 promotes survival of Burkitt's lymphoma cells by down-regulating the expression of Bim. *Biochem Biophys Res Commun* *511*, 787–793.
- Wang'Ondu, R., Teal, S., Park, R., Heston, L., Delecluse, H., and Miller, G. (2015). DNA damage signaling is induced in the absence of Epstein - Barr virus (EBV) Lytic DNA replication and in response to expression of ZEBRA. *PLoS ONE*.
- Watt, F., and Molloy, P.L. (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev* *2*, 1136–1143.
- Weinstock, D.M., Brunet, E., and Jasin, M. (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol* *9*, 978–981.
- Wen, W., Iwakiri, D., Yamamoto, K., Maruo, S., Kanda, T., and Takada, K. (2007). Epstein-Barr virus BZLF1 gene, a switch from latency to lytic infection, is expressed as an immediate-early gene after primary infection of B lymphocytes. *J. Virol.* *81*, 1037–1042.
- White, R.E., Rämer, P.C., Naresh, K.N., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., et al. (2012). EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J. Clin. Invest.* *122*, 1487–1502.
- Willmann, K.L., Milosevic, S., Pauklin, S., Schmitz, K.-M., Rangam, G., Simon, M.T., Maslen, S., Skehel, M., Robert, I., Heyer, V., et al. (2012). A role for the RNA pol II-associated PAF complex in AID-induced immune diversification. *J Exp Med* *209*, 2099–2111.

- Wilson, J.B., Manet, E., Gruffat, H., Busson, P., Blondel, M., and Fahraeus, R. (2018). EBNA1: Oncogenic Activity, Immune Evasion and Biochemical Functions Provide Targets for Novel Therapeutic Strategies against Epstein-Barr Virus- Associated Cancers. *Cancers (Basel)* *10*.
- Wright, W.D., Shah, S.S., and Heyer, W.-D. (2018). Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* *293*, 10524–10535.
- Xicoy, B., Ribera, J.-M., Esteve, J., Brunet, S., Sanz, M.-A., Fernández-Abellán, P., and Feliu, E. (2003). Post-transplant Burkitt's leukemia or lymphoma. Study of five cases treated with specific intensive therapy (PETHEMA ALL-3/97 trial). *Leuk Lymphoma* *44*, 1541–1543.
- Xie, M., Leroy, H., Mascarau, R., Woottum, M., Dupont, M., Ciccone, C., Schmitt, A., Raynaud-Messina, B., Vérollet, C., Bouchet, J., et al. (2019). Cell-to-Cell Spreading of HIV-1 in Myeloid Target Cells Escapes SAMHD1 Restriction. *MBio* *10*, e02457-19, /mbio/10/6/mBio.02457-19.atom.
- Xu, W., Santini, P.A., Sullivan, J.S., He, B., Shan, M., Ball, S.C., Dyer, W.B., Ketas, T.J., Chadburn, A., Cohen-Gould, L., et al. (2009). HIV-1 evades virus-specific IgG2 and IgA responses by targeting systemic and intestinal B cells via long-range intercellular conduits. *Nat Immunol* *10*, 1008–1017.
- Xu, Y., Gong, Y.Y., and Routledge, M.N. (2018). Aflatoxin exposure assessed by aflatoxin albumin adduct biomarker in populations from six African countries.
- Xu, Z., Pone, E.J., Al-Qahtani, A., Park, S.-R., Zan, H., and Casali, P. (2007). Regulation of aicda expression and AID activity: relevance to somatic hypermutation and class switch DNA recombination. *Crit Rev Immunol* *27*, 367–397.
- Xue, M., Yao, S., Hu, M., Li, W., Hao, T., Zhou, F., Zhu, X., Lu, H., Qin, D., Yan, Q., et al. (2014). HIV-1 Nef and KSHV oncogene K1 synergistically promote angiogenesis by inducing cellular miR-718 to regulate the PTEN/AKT/mTOR signaling pathway. *Nucleic Acids Res* *42*, 9862–9879.
- Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., and Yamamoto, N. (2000). Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* *484*, 153–158.
- Yang, L., Aozasa, K., Oshimi, K., and Takada, K. (2004). Epstein-Barr virus (EBV)-encoded RNA promotes growth of EBV-infected T cells through interleukin-9 induction. *Cancer Res* *64*, 5332–5337.
- Yarchoan, R., and Uldrick, T.S. (2018). HIV-Associated Cancers and Related Diseases. *New England Journal of Medicine* *378*, 1029–1041.
- Yawetz, S., Cumberland, W.G., van der Meyden, M., and Martínez-Maza, O. (1995). Elevated serum levels of soluble CD23 (sCD23) precede the appearance of acquired immunodeficiency syndrome--associated non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* *85*, 1843–1849.
- Young, L.S., Yao, Q.Y., Rooney, C.M., Sculley, T.B., Moss, D.J., Rupani, H., Laux, G., Bornkamm, G.W., and Rickinson, A.B. (1987). New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J Gen Virol* *68 (Pt 11)*, 2853–2862.
- Young, L.S., Arrand, J.R., and Murray, P.G. (2007). EBV gene expression and regulation. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis*, A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), p.
- Zajac-Kaye, M., Gelmann, E.P., and Levens, D. (1988). A point mutation in the c-myc locus of a Burkitt lymphoma abolishes binding of a nuclear protein. *Science* *240*, 1776–1780.
- Zauli, G., and Gibellini, D. (1996). The human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) Tat protein and Bcl-2 gene expression. *Leuk Lymphoma* *23*, 551–560.
- Zauli, G., Gibellini, D., Milani, D., Mazzoni, M., Borgatti, P., La Placa, M., and Capitani, S. (1993). Human immunodeficiency virus type 1 Tat protein protects lymphoid, epithelial, and neuronal cell lines from death by apoptosis. *Cancer Res* *53*, 4481–4485.
- Zauli, G., Gibellini, D., Caputo, A., Bassini, A., Negrini, M., Monne, M., Mazzoni, M., and Capitani, S. (1995). The human immunodeficiency virus type-1 Tat protein upregulates Bcl-2 gene expression in Jurkat T-cell lines and primary peripheral blood mononuclear cells. *Blood* *86*, 3823–3834.

- Zech, L., Haglund, U., Nilsson, K., and Klein, G. (1976). Characteristic chromosomal abnormalities in biopsies and lymphoid-cell lines from patients with Burkitt and non-Burkitt lymphomas. *Int J Cancer* 17, 47–56.
- Zeitz, M.J., Mukherjee, L., Bhattacharya, S., Xu, J., and Berezney, R. (2009). A probabilistic model for the arrangement of a subset of human chromosome territories in WI38 human fibroblasts. *J Cell Physiol* 221, 120–129.
- Zeng, M., Chen, Y., Jia, X., and Liu, Y. (2020). The Anti-Apoptotic Role of EBV-LMP1 in Lymphoma Cells. *Cancer Manag Res* 12, 8801–8811.
- Zhang, F., and Gong, Z. (2021). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice: a new focus on 53BP1. *J Zhejiang Univ Sci B* 22, 38–46.
- Zhang, M., and Coffino, P. (2004). Repeat sequence of Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 protein interrupts proteasome substrate processing. *J Biol Chem* 279, 8635–8641.
- Zhang, Y., and Jasin, M. (2011). An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway. *Nat Struct Mol Biol* 18, 80–84.
- Zhang, Y., and Rowley, J.D. (2006). Chromatin structural elements and chromosomal translocations in leukemia. *DNA Repair (Amst)* 5, 1282–1297.
- Zhang, H., Li, Y., Wang, H.-B., Zhang, A., Chen, M.-L., Fang, Z.-X., Dong, X.-D., Li, S.-B., Du, Y., Xiong, D., et al. (2018). Author Correction: Ephrin receptor A2 is an epithelial cell receptor for Epstein-Barr virus entry. *Nat Microbiol* 3, 1075.
- Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., and Alt, F.W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv Immunol* 106, 93–133.
- Zhao, B., Maruo, S., Cooper, A., R Chase, M., Johannsen, E., Kieff, E., and Cahir-McFarland, E. (2006). RNAs induced by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1900–1905.
- Zheng, L., Yang, Y., Guocai, L., Pauza, C.D., and Salvato, M.S. (2007). HIV Tat protein increases Bcl-2 expression in monocytes which inhibits monocyte apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-induced ligand. *Intervirology* 50, 224–228.
- Zhu, C., Mills, K.D., Ferguson, D.O., Lee, C., Manis, J., Fleming, J., Gao, Y., Morton, C.C., and Alt, F.W. (2002). Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* 109, 811–821.
- Zhu, X., Guo, Y., Yao, S., Yan, Q., Xue, M., Hao, T., Zhou, F., Zhu, J., Qin, D., and Lu, C. (2014). Synergy between Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) vIL-6 and HIV-1 Nef protein in promotion of angiogenesis and oncogenesis: role of the AKT signaling pathway. *Oncogene* 33, 1986–1996.
- Ziegler, J.L., Drew, W.L., Miner, R.C., Mintz, L., Rosenbaum, E., Gershow, J., Lennette, E.T., Greenspan, J., Shillitoe, E., Beckstead, J., et al. (1982). Outbreak of Burkitt's-like lymphoma in homosexual men. *Lancet* 2, 631–633.
- Zila, V., Margiotta, E., Turoňová, B., Müller, T.G., Zimmerli, C.E., Mattei, S., Allegretti, M., Börner, K., Rada, J., Müller, B., et al. (2021). Cone-shaped HIV-1 capsids are transported through intact nuclear pores. *Cell* 184, 1032–1046.e18.
- Zink, D., Amaral, M.D., Englmann, A., Lang, S., Clarke, L.A., Rudolph, C., Alt, F., Luther, K., Braz, C., Sadoni, N., et al. (2004). Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei. *J Cell Biol* 166, 815–825.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol* 8, 870–876.
- Zuleger, N., Boyle, S., Kelly, D.A., de las Heras, J.I., Lazou, V., Korfali, N., Batrakou, D.G., Randles, K.N., Morris, G.E., Harrison, D.J., et al. (2013). Specific nuclear envelope transmembrane proteins can promote the location of chromosomes to and from the nuclear periphery. *Genome Biol* 14, R14.

Titre : Rôle des virus EBV et VIH dans la formation de la translocation chromosomique t(8 ;14) du Lymphome de Burkitt

Mots clés : Lymphome de Burkitt, EBV, VIH, translocation chromosomique, réparation ADN, architecture nucléaire

Résumé : Le Lymphome de Burkitt est un lymphome non hodgkinien de type B caractérisé dans 80% des cas par une translocation chromosomique impliquant l'oncogène *MYC* sur le chromosome 8 et le gène des chaînes lourdes d'immunoglobuline *IGH* sur le chromosome 14. Le développement de ce lymphome est étroitement lié au virus EBV, systématiquement présent dans les formes endémiques et au VIH qui lui définit une entité clinique à part. Cependant, le rôle joué par ces virus dans la formation de la translocation est peu connu. Des cassures double brins simultanées, une réparation non-homologue de ces cassures et une proximité spatiale sont les conditions nécessaires pour que deux loci forment une translocation. Nous avons ainsi investigué l'effet des virus EBV sur ces trois conditions dans les lymphocytes B.

Nos résultats montrent que la réactivation du virus EBV dans les lymphocytes B infectées de façon latente augmente la proximité spatiale entre *MYC* et *IGH*, normalement situés dans des compartiments différents. Cette relocalisation semble être secondaire à l'induction de dommages d'ADN spécifiques sur *MYC* et serait médiée par la protéine de réparation de l'ADN MRE11. Nous montrons aussi que la protéine Tat du VIH-1 peut pénétrer dans les cellules B et y induire une expression aberrante du gène *AICDA* qui peut secondairement introduire des cassures doubles brins simultanées sur *MYC* et *IGH*.

Ce travail fournit une preuve de l'implication directe du cycle lytique d'EBV dans la formation de la t(8;14) et renforce les données existantes sur le rôle de Tat dans cette translocation.

Title: Role of EBV and HIV in the generation of Burkitt's lymphoma t(8;14) chromosomal translocation

Keywords: Burkitt's lymphoma, EBV, HIV, chromosomal translocation, DNA repair, nuclear architecture

Abstract: Burkitt's lymphoma is a B cell non-Hodgkin's lymphoma characterized in 80% of cases by a chromosomal translocation involving the *MYC* oncogene on chromosome 8 and the immunoglobulin heavy chain gene *IGH* on chromosome 14. The development of this lymphoma is intricately linked to the EBV virus, almost always present in endemic forms, and to HIV, which defines a clinical entity. However, little is known about the role played by these viruses in translocation formation. Simultaneous double strand breaks, non-homologous repair of these breaks and spatial proximity are the conditions necessary for two loci to form a translocation. We thus investigated the effect of EBV viruses on these three conditions in B lymphocytes.

Our results show that EBV reactivation in latently infected B lymphocytes increases the spatial proximity between *MYC* and *IGH*, normally located in different compartments. Specific DNA damage on *MYC* locus seems to induce this relocation of *MYC* next to *IGH* in a MRE11-dependant mechanism. We also show that the HIV1-Tat protein can enter B cells and induce an aberrant expression of the *AICDA* gene increasing the risk of simultaneous DNA double strand breaks on *MYC* and *IGH* loci.

This work provides evidence for the direct involvement of the EBV lytic cycle in t (8; 14) formation and strengthens previously described data on of HIV1-Tat's role in this translocation.