

Rôle de la protéine ATM dans le contrôle de la latence du virus d'Epstein Barr

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n° 582
Cancérologie : Biologie – Médecine – Santé (CBMS)
Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue à Paris, le 5 Novembre 2019, par

Mr Moussab TATFI

Composition du Jury :

Mr Pierre BUSSON M.D., Ph.D., DR2 CNRS Institut Gustave Roussy, UMR 8126	Président du Jury
Mr Ioannis THEODOROU M.D., Ph.D., Professeur associé Hôpital Saint-Louis, Pôle Biologie-Pathologie-Physiologie	Rapporteur
Mme Hélène DUTARTRE Ph.D., CR1 INSERM Center for International Research on Infectiology, UMR 1111	Rapporteur
Mme Caroline BESSON Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Centre Hospitalier de Versailles, U1018	Examineur
Mme Fanny LANTERNIER Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Hôpital Universitaire Necker Enfants malades, UMR 2000	Examineur
Mr Felipe SUAREZ Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Institut Imagine, UMR 1163	Directeur de thèse
Mr Olivier HERMINE Professeur des Universités – Praticien Hospitalier Institut Imagine, UMR 1163	Invité

Remerciements

Je voudrais d'abord remercier vivement mon directeur de thèse, le Pr Felipe Suarez, pour m'avoir encadré et soutenu tout au long de cette thèse et de l'année de master qui l'a précédé, et pour m'avoir laissé une grande autonomie dans l'élaboration de mes projets. Son exigence et sa rigueur scientifique m'ont grandement stimulé.

Je remercie beaucoup le Pr Olivier Hermine pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein de son laboratoire, de m'avoir encouragé et soutenu dans les moments difficiles et de m'avoir partagé ses brillantes intuitions scientifiques. Sa nature de voir toujours le côté positif des résultats donne l'énergie nécessaire à la poursuite des expérimentations.

Je tiens à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie particulièrement le Dr Hélène Dutartre, le Pr Caroline Besson et le Pr Ioannis Theodorou pour avoir pris le temps de lire et de corriger ce manuscrit. Je remercie le Dr Pierre Busson pour ses conseils éclairés et pour l'honneur qu'il m'a accordé en acceptant de présider le jury. C'est à lui que je dois l'origine de ma passion pour l'EBV. Un grand merci également au Pr Fanny Lanternier en sa qualité d'examineur.

Les moments partagés avec le labo 217 (et ses succursales) resteront à jamais gravés dans ma mémoire et dans mon cœur. Merci à ma voisine de paillasse Flavia Guillem qui a toujours fait son possible pour m'aider et m'a formé à la plupart des techniques à mes débuts. A mon camarade et grand ami Simon Nicoletti, le bureau était silencieux en son absence. A Mathilde Lamarque avec sa bonne humeur quotidienne et ses succulents gâteaux. A Francine Côté, dont les discussions orientées vers le Québec et les souris étaient toujours intéressantes. A Hervé Souchet qui laisse des traces bretonnes partout sur son passage, mais bon on ne peut qu'apprécier cette belle région ! A Morgane Cheminant et à Rachel Rignault qui subliment ce tableau. Merci également aux nouveaux membres du bureau 217 actuellement plus si nouveau que ça, Elia Colin, Guillemette Fouquet et en particulier Laura Polivka, pour son soutien et sa grande gentillesse.

Un merci chaleureux à mes autres collègues de laboratoire, Justine Siavellis, Sandra Mignot, Leila Maouche, Yves Lepelletier, Zakia Belaid, Asma Smahi, et tous ceux que je n'ai pas cité.

Je me dois également de remercier les membres de l'association YR2I dont j'étais membre actif, ainsi que les membres de l'association de sport d'Imagine, spécialement Clarisse Ganier, Diana Dinca, Hicham Lamrini, Tristan Felix, Sonny Nguyen, Julien Fregeac et tous les autres.

J'exprime mes sincères remerciements à l'équipe bioinformatique de l'institut Pasteur, tout particulièrement Emeline Perthame et Kenzo-Hugo Hillion qui m'ont aidé à élaborer ces travaux, ainsi que tout le personnel des plateformes techniques d'Imagine qui y ont participé de près ou de loin.

Pour finir un grand merci à tous mes amis qui m'ont soutenu durant cette thèse et à ma famille, en particulier mes parents qui ont toujours cru en moi. Ils ont fait de moi ce que je suis et ont été présents à chaque étape de ma vie.

Sommaire

<u>I. INTRODUCTION</u>	13
1. INTRODUCTION	15
2. L'ATAXIE TELAGIECTASIE	16
a. Caractéristiques génétiques et cliniques	16
b. Caractéristiques immunologiques	17
3. ATM : UN HUB DE SIGNALISATION	18
a. Description d'ATM	18
b. ATM joue un rôle primordial dans la voie de réponse aux CDB	19
i. ATM permet la réparation des cassures double-brin	19
ii. ATM induit l'arrêt du cycle cellulaire	22
iii. ATM induit l'apoptose en cas de réparation impossible	23
iv. ATM intervient dans le remodelage de la chromatine	24
c. Implications d'ATM dans d'autres voies de signalisation	25
i. Stress oxydatif	26
ii. Métabolisme	27
4. PREDISPOSITION DES PATIENTS ATTEINTS D'AT AUX NEOPLASIES	27
5. CYCLE DE VIE DU VIRUS D'EPSTEIN BARR	29
a. Un virus humain associé à de multiples néoplasies	29
b. Etablissement de la latence virale	30
c. Evolution de la cellule infectée <i>in vivo</i>	32
i. Une puissante réponse immunitaire	32
ii. Vers une restriction progressive de la latence	33
d. Evolution de la cellule infectée <i>in vitro</i>	37
i. Génération de lignées immortalisées	37
ii. Une faible efficacité de transformation	37

6. MECANISMES SOUS-JACENTS A LA SENSIBILITE DE L'AT A L'EBV	38
a. Dysfonction immunitaire de l'AT	38
b. Données probantes sur le rôle d'ATM lors d'une infection à EBV	40
i. Lors du cycle lytique	40
ii. Lors de la latence	42
7. PROBLEMATIQUE	44
8. METHODE EXPERIMENTALE	46
a. Choix du modèle expérimental	46
i. Choix des lignées lymphoblastoïdes	46
ii. Etablissement des lignées	47
b. Objectifs généraux	47
i. Etude de l'expression des gènes de latence	47
ii. Etude de la restriction de la latence	48
<u>II. Matériels et Méthodes</u>	51
1. MATERIEL BIOLOGIQUE	53
1. Etablissement des lignées lymphoblastoïdes	53
2. Culture cellulaire	54
3. Traitements	54
2. TECHNIQUES UTILISEES	55
1. Prolifération	55
2. SeaHorse	55
3. Cycle cellulaire	56
4. Immunofluorescence	56
5. RT-PCR quantitative	56
6. Western Blot	58

7. Séquençage d'ARN	58
1. Extraction de l'ARN et analyse qualité	58
2. Construction de la bibliothèque	59
3. Séquençage	59
4. Analyse bioinformatique	60
8. Construction des vecteurs Crispr/CAS9	60
9. Phosphokinome	60
10. Statistiques	60
<u>III. Résultats</u>	61
1. CHAPITRE I : CARACTERISATION DES LIGNEES	63
1. Défaut fonctionnel d'ATM	65
2. Avantage prolifératif des LCL-AT	66
3. Expression basale des gènes de latence virale	68
4. Expression des gènes de latence après activation d'ATM	69
5. CRISPR/Cas9	71
2. CHAPITRE II : ARTICLE	75
1. Mise en contexte	77
2. Article	77
3. Exploration de la fonction mitochondriale	112
3. CHAPITRE III : REPONSE A LA STIMULATION DU BCR ET A L'IL21	115
1. Mise en contexte	117
2. Expression des gènes viraux après activation du lymphocyte B	117
3. BCR/IL21 en RNA-seq	120
1. BCR	120
2. IL21	121
4. Exploration de la voie de l'IL21	129
1. Expression du récepteur à l'IL21	129
2. Analyse du phosphokinome	130

<u>IV. DISCUSSION</u>	131
1. Discussion des résultats	133
a. Introduction	133
b. Prolifération et traduction	133
c. Latence de l'EBV	135
d. Effet de l'IL21	136
2. Pertinence du modèle LCL	137
3. Perspective : implication d'ATM dans les étapes précoces de l'infection	140
4. Conclusion	142
<u>V. REFERENCES</u>	143
<u>VI. ANNEXE : REVIEW PUBLIEE A PARTIR DE L'INTRODUCTION DE CETTE THESE</u>	171

Liste des abréviations

AEJ	Alternative End-Joining
AT	Ataxia-Telangiectasia
BCR	B-cell Receptor
BLT	Bone-marrow-Liver-Thymus
CDB	Cassure Double-Brin
CEREDIH	CEntre de RÉférence des DéficiTs Immunitaires HéRéditaires
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CRISPR/Cas9	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR Associated protein 9
CTL	Cytotoxic T Lymphocyte
CTP	Cytidine TriPhosphate
DE	Différentiellement exprimé
DIP	Déficit Immunitaire Primitif
EBER	Epstein-Barr virus-Encoded small RNAs
EBNA	Epstein-Barr virus Nuclear Antigens
EBV-LPD	Epstein-Barr virus associated LymphoProliferative Disorders
EGSEA	Ensemble of Gene Set Enrichment Analyses
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FPKM	Fragments Per Kilobase Million
HR	Homologous Recombination
KSHV	Kaposi's Sarcoma-associated HerpesVirus
LCL	Lymphoblastoid-Cell Line
LMP	Latent Membrane Protein
MHV68	Murine γ -HerpesVirus 68
MRN	complexe Mre11, Rad50 et Nbs1
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
NPC	NasoPharyngeal Carcinoma
NURD	Nucleosome Remodeling Deacetylase complex
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell

RIN	RNA integrity number
ROS	Reactive Oxygen Species
TBST	Tris-Buffered Saline-Tween
TCR	T-Cell Receptor
XMEN	X-linked immunodeficiency with Magnesium defect, EBV infection, and neoplasia

Liste des figures

- Figure 1 : Schéma de la structure de la protéine ATM.
- Figure 2 : Activation d'ATM et signalisation en aval en réponse à une CDB.
- Figure 3. Réparation de l'ADN par les voies HR et NHEJ.
- Figure 4 : Cycle de vie de l'EBV
- Figure 5 : Rôle central d'ATM dans le compartiment de réplication d'EBV.
- Figure 6 : ATM est régulée par EBV pendant la latence.
- Figure 7 : Implication potentielle d'ATM dans la régulation de la latence EBV.
- Figure 8 : Expression d'ATM et exploration de sa fonction.
- Figure 9 : Exploration de la vitesse de prolifération des lignées LCL-AT.
- Figure 10 : Analyse de l'expression du panel de gènes viraux et de la protéine LMP-2A.
- Figure 11 : Analyse de l'expression du panel de gènes viraux après induction de CDB.
- Figure 12 : Vecteur et guides utilisés pour la transfection par Crispr/Cas9.
- Figure 13 : Analyse du séquençage après modification par Crispr.
- Figure 14 : Efficacité de la transduction sur une lignée LCL-WT.

Paper Figure 1 : Overview of RNA-seq data generated from lymphoblastoid cell lines derived from 7 AT and 5 unaffected control individuals.

Paper Figure 2 : GO analysis of differentially expressed genes and functional exploration.

Paper Figure 3 : EGSEA analysis of differentially expressed genes.

Paper Figure 4 : RNA seq results of the viral genome.

Paper Figure 5 : Heatmaps of EBV interactome.

Supplemental Figure 1 : GO analysis of differentially expressed genes

Supplemental Figure 2 : Exploration of rRNA content.

Supplemental Figure 3 : RNA-seq coverage across an intergenic region of EBV genome.

- Figure 15 : Etude de la fonction mitochondriale des LCL-AT.
- Figure 16 : Influence de l'activation du BCR et de la stimulation par IL21 sur l'expression des gènes viraux.
- Figure 17 : Analyse des résultats du RNA seq après stimulation par IL21.
- Figure 18 : Analyse par GO des gènes DE après stimulation par IL21.
- Figure 19 : Analyse EGSEA des Gene-Sets associés à l'activation par l'IL21.
- Figure 20 : Analyse EGSEA des gènes DE après stimulation par l'IL21.
- Figure 21 : Visualisation du génome viral.
- Figure 22 : Expression des gènes de latence de l'EBV après stimulation par l'IL21.
- Figure 23 : Expression du récepteur à l'IL21 dans les LCL-AT.
- Figure 24 : Analyse du phosphokinome en condition basale et après stimulation par IL21.
- Figure 25 : Schéma de la série de RNA-seq permettant l'étude des étapes précoces de l'infection par EBV.

Liste des tableaux

- Tableau 1 : Tumeurs malignes lymphoïdes et non lymphoïdes associées à l'EBV.
- Tableau 2 : Mutation du gène *ATM* dans les LCL-AT.
- Tableau 3 : Liste des primers et des sondes de RT-PCR quantitative.
- Tableau 4 : Conditions d'analyse du RNA-seq.

I. INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

Le virus Epstein-Barr (EBV) est un γ -herpesvirus qui infecte environ 95% des adultes dans le monde. L'EBV a un tropisme pour les cellules épithéliales où la réplication lytique se produit, et les lymphocytes B où l'infection latente est établie. Les différentes phases de l'infection par l'EBV sont étroitement contrôlées tout au long de la vie de l'hôte infecté, et l'infection chronique chez les individus immunocompétents est essentiellement asymptomatique (Miyashita et al., 1995). Cependant, le contrôle de l'infection chronique par l'EBV chez les patients immunodéprimés peut être insuffisant, conduisant à différents types d'immunopathologies, tels que les lymphohistiocytoses hémophagocytaires et les syndromes lymphoprolifératifs (Kim et al., 2017) (ci-après dénommés EBV-LPD pour *EBV-associated lymphoproliferative disorders*).

Plusieurs déficits immunitaires primaires (DIP) sont associés à un mauvais contrôle de l'EBV et sont également associés à un risque accru de EBV-LPD (Cohen et al., 2015). En effet, certaines anomalies génétiques héréditaires associées aux DIP peuvent affecter la réponse immune cytotoxique spécifique de l'EBV, voire l'abroger complètement pour certaines d'entre elles. Les études portant sur les DIP et leurs mécanismes moléculaires sous-jacents ont permis de mieux comprendre les processus immunologiques et cellulaires contrôlant l'infection à EBV.

L'EBV infecte les lymphocytes B *in vivo* et *in vitro* et peut conduire à leur immortalisation. Les gènes latents de l'EBV dont l'expression est étroitement régulée, entraînent une activation et une prolifération des lymphocytes B infectés (Young et Rickinson, 2004). Une réponse cytotoxique puissante combinée à une activation des lymphocytes B infectés conduit à une restriction progressive de l'expression des gènes de latence. La dérégulation de cette interaction complexe et dynamique entre l'expression des gènes viraux et de l'activation cellulaire peut conduire à une transformation cellulaire.

L'ataxie télangiectasie (AT) est un DIP rare causé par une mutation du gène *ATM*. Les patients atteints d'AT présentent un risque accru de cancer, y compris d'EBV-LPD (Suarez et al., 2015).

Cependant, l'ampleur du déficit immunitaire dans l'AT est variable et la plupart des patients ne présentent que des altérations immunologiques mineures (Nowak-Wegrzyn et al., 2004). La kinase ATM intervient dans de nombreuses fonctions allant de la réparation de l'ADN à la modulation de l'expression des gènes. Paradoxalement, alors que la fréquence des EBV-LPD est augmentée chez les patients atteints d'AT, ils ne présentent pas de déficit majeur en lymphocytes T.

Sur la base de cette observation, nous émettons l'hypothèse que le défaut d'ATM dans les cellules infectées par EBV pourrait perturber la latence de l'EBV, favorisant un programme de latence plus enclin à la lymphomagenèse. Dans cette introduction, nous examinerons les caractéristiques de l'AT, décrivons les rôles d'ATM et le cycle de l'EBV, puis discuterons des anomalies immunologiques et cellulaires susceptibles de créer une prédisposition aux EBV-LPD. Une partie de cette introduction est la traduction française d'une revue publiée dans « *Frontiers in Immunology* » au cours de cette thèse.

2. L'ATAXIE TELANGIECTASIE

a. Caractéristiques cliniques

L'ataxie-télangiectasie (AT) est une maladie autosomique récessive causée par la mutation bi-allélique du gène *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM). C'est une maladie rare avec environ 1 / 300.000 naissances vivantes (Woods et al., 1990). L'AT a été décrite pour la première fois par Syllaba et Henner en 1926 (Syllaba et Henner, 1926). Elle a ensuite été davantage caractérisée par Denise Louis-Bar (Louis-Bar, 1941) et finalement nommée par Boder et Sedgwick en 1958 (Boder et Sedgwick, 1958).

Plus de 400 mutations du gène *ATM* ont été rapportées (base de données Leiden Open Variation). La plupart de ces mutations entraînent une perte complète de l'expression de la protéine *ATM*, mais des mutations faux-sens et d'épissage peuvent entraîner l'expression d'une protéine ayant une activité kinase résiduelle (Staples et al., 2008).

La protéine ATM intervient principalement dans la réparation des cassures double-brin (CDB) et la prise en charge des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*).

L'AT est caractérisée par une neurodégénérescence progressive conduisant à une ataxie cérébelleuse, des télangiectasies oculo-cutanées, des degrés variables d'immunodéficience, une incidence accrue de cancers, une augmentation du taux d' α -foetoprotéine sérique (Taylor et al., 1996) et une hypofertilité. Les organes touchés sont ceux qui sont les plus sensibles aux CDB et aux ROS, notamment les cellules de Purkinje et les cellules endothéliales. Cependant, la présentation clinique est très hétérogène avec une pénétrance variable.

La forme classique de l'AT commence généralement vers l'âge de 2 ans par des signes d'ataxie. Les symptômes s'aggravent progressivement et la plupart des patients finissent par se déplacer en fauteuil roulant à l'âge de 10 ans. Des formes atypiques d'AT peuvent apparaître plus tardivement et se développer lentement (Méneret et al., 2014). Les patients atteints d'AT ont une espérance de vie réduite avec une médiane de survie de 19 à 25 ans (Micol et al., 2011, Crawford et al., 2006). La mortalité est principalement due aux infections des voies respiratoires et aux cancers (Nowak-Wegrzyn et al., 2004).

b. Caractéristiques immunologiques

Les patients atteints d'AT présentent une immunodéficience très variable, consistant en une lymphopénie B et T modérée chez environ 70% des patients (Nowak-Wegrzyn et al., 2004). Plus de 60% des patients présentent également des taux anormaux d'immunoglobuline sérique, notamment un déficit en IgG4 (65%), en IgA (63%) et en IgG2 (48%) (Nowak-Wegrzyn et al., 2004). Cette immunodéficience est rarement progressive contrairement à l'atteinte neurologique, et certains patients n'en sont pas affectés (Staples et al., 2008). Les patients présentant une perte complète de la protéine ATM ont généralement un phénotype immunologique plus sévère que les patients présentant une activité résiduelle de la kinase ATM. Souvent, une hypoplasie thymique est observée chez ces patients et concorde avec la lymphopénie (Micheli et al, 2003).

ATM joue un rôle primordial dans le développement des lymphocytes car elle permet la réparation des CDB survenant au cours de l'ontogenèse des lymphocytes B et T (Lumsden et al., 2004), en particulier lors de la recombinaison V-(D)-J (Bredemeyer et al., 2006). En conséquence, une réparation défectueuse des CDB chez les patients atteints d'AT provoque une instabilité génomique conduisant à une lymphopénie B et T. Cependant, la réparation des CDB demeure possible par une voie non canonique ATM-indépendante, la voie alternative des jonctions d'extrémités (AEJ pour *alternative end-joining*). Cette voie est moins efficace et est encore mal comprise (Kotnis et al., 2009), mais pourrait expliquer le faible degré de lymphopénie chez les patients atteints d'AT (Pan et al., 2002). Enfin, les cellules immunitaires des patients atteints d'AT ont une sensibilité accrue à l'induction de l'apoptose par voie extrinsèque, ce qui contribue au développement de cette lymphopénie (Carney et al., 2012).

Malgré cette immunodéficiences, les infections virales sévères et les infections opportunistes demeurent rares (Nowak-Wegrzyn et al., 2004), probablement en raison d'une réponse lymphocytaire T intacte (Pashankar et al., 2006). La réponse vaccinale est de plus correcte avec certains patients présentant une réponse totalement normale et d'autres présentant une réponse réduite (Nowak-Wegrzyn et al., 2004).

3. ATM : UN HUB DE SIGNALISATION

a. Description d'ATM

Le gène *ATM* a d'abord été identifié et cloné par Savitsky en 1995. *ATM* est situé sur le chromosome 11q22-q23 et s'étend sur environ 160 kb d'ADN génomique. Il code pour un transcrit de 13 kb de 66 exons sans preuve de formes d'épissage alternatif (Uziel et al., 1996). Le gène *ATM* code pour une sérine / thréonine kinase de 350 kDa appartenant à la famille des kinases liées à la phosphatidylinositol 3-kinase (PIKK) (Shiloh, 2003). Comme les autres membres de sa famille, elle possède un domaine Kinase, stabilisé et régulé par un domaine FAT (*Focal Adhesion kinase, Targeting domain*) et un domaine FATC (*FRAP, ATM, TRRAP C-terminal domain*, Figure 1). Un site de liaison au substrat situé près de l'extrémité N-terminale est important pour la liaison de p53, NBS1 et BRCA1 (Fernandes et al., 2005).

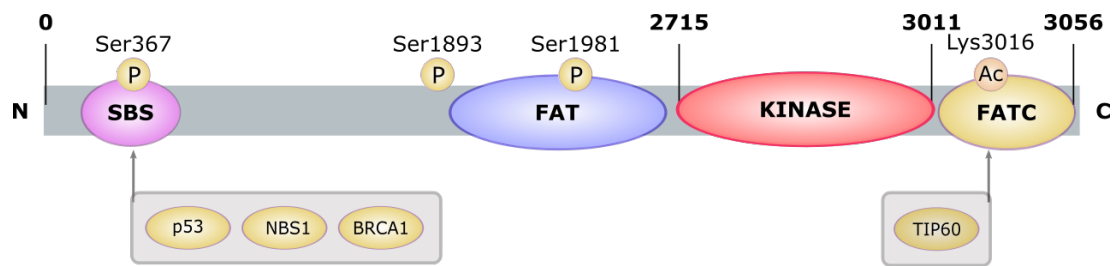


Figure 1 : Schéma de la structure de la protéine ATM. Ce schéma montre les emplacements des domaines SBS, FAT, kinase et FATC, ainsi que les sites d'autophosphorylation (P) et d'acétylation (Ac). Le domaine SBS (Substrate Binding Site : site de liaison au substrat) est important pour l'interaction d'ATM avec les protéines p53, NBS1 ou BRCA1. ATM peut être autophosphorylée sur les sites Ser367, Ser1893, Ser1981 ou acétylée sur le site Lys3016 par l'acétyltransférase TIP60. (Inspiré de Lavin, 2008).

Les protéines ATM sont principalement localisées dans le noyau sous forme de dimères inactifs, mais environ 20% se trouvent dans le cytoplasme, principalement dans les peroxysomes, les endosomes et sous forme de protéines solubles (Lavin, 2008). ATM intervient dans de nombreuses fonctions cellulaires, notamment le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le stress oxydatif, le métabolisme mitochondrial, la régulation des gènes et la maintenance des télomères, mais l'un de ses principaux rôles est son implication dans la réparation des CDB de l'ADN (Shiloh et Ziv, 2013).

b. ATM joue un rôle primordial dans la voie de réponse aux CDB

i. ATM permet la réparation des CDB

Les CDB peuvent se produire à la suite de processus endogènes, lors du blocage des fourches de réplication ou des réarrangements géniques tels que la méiose, la recombinaison V-(D)-J ou la commutation de classe. Elles peuvent également être causées par facteurs exogènes tels que les rayonnements ionisants ou la chimiothérapie (Friedberg et al., 2004). Les CDB peuvent entraîner des délétions, des translocations et des fusions chromosomiques. Leur prise en charge est par conséquent essentielle pour le maintien de la stabilité du génome et la prévention des cancers.

ATM est partiellement activée dans les secondes suivant une CDB, probablement à la suite de la relaxation de la chromatine adjacente à la cassure. Cette activation partielle permet notamment à la kinase de phosphoryler p53. De manière concomitante, la protéine MDC1 se place sur les berges de la cassure et recrute la protéine ATM ainsi que le complexe MRN, composé des protéines MRE11, RAD50 et NBS1. Celui-ci reconnaît alors le site de la CDB et recrute à son tour ATM. L'association du dimère d'ATM avec le complexe MRN déclenche l'autophosphorylation du dimère sur les sérines 367, 981 et 1983. L'acétylation d'ATM sur la lysine 3016 médiée par l'acétyltransférase TIP60 complète cette activation (Sun et al., 2007), conduisant à une transition de la forme dimérisée vers la forme de monomères actifs (Bakkenist et Kastan, 2003). ATM phosphoryle alors H2AX, une variante de la famille des histones H2A, en formant des foyers γ H2AX qui servent de support pour le recrutement de protéines de réparation de l'ADN telles que MDC1, 53BP1 et BRCA1. Certains autres partenaires importants sont phosphorylés par ATM, tels que CHK2 et p53, qui initient les événements en aval de la réparation de l'ADN et induisent un arrêt du cycle cellulaire ou une apoptose en cas d'échec de la réparation de l'ADN (Shiloh et Ziv, 2013) (Figure 2).

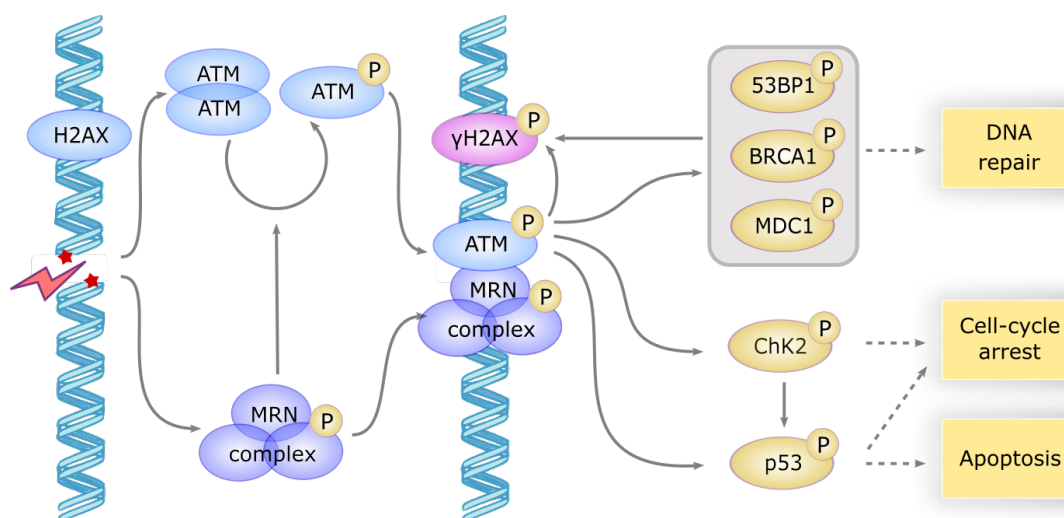


Figure 2 : Activation d'ATM et signalisation en aval en réponse à une CDB. La CDB induit une activation rapide du dimère ATM et du complexe MRN, qui induit à son tour l'autophosphorylation et la monomérisation de la protéine ATM. ATM devient pleinement actif et phosphoryle un large sous-groupe de protéines en aval, notamment γ H2AX, qui sert de support au recrutement des protéines de réparation MDC1, BP53 et BRCA1 impliquées dans la réparation de l'ADN, CHK2 impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire et p53 impliqué dans l'induction de l'apoptose. La protéine CHK2 phosphoryle également p53 pour favoriser l'arrêt du cycle cellulaire ou induire l'apoptose si la réparation est impossible.

La formation du complexe MRN et l'activation d'ATM permettent d'initier la réparation de l'ADN qui se fait par deux voies principales (Figure 3), la recombinaison homologue (HR pour *homologous recombination*) et la jonction d'extrémités non homologues (NHEJ pour *non-homologous end-joining*).

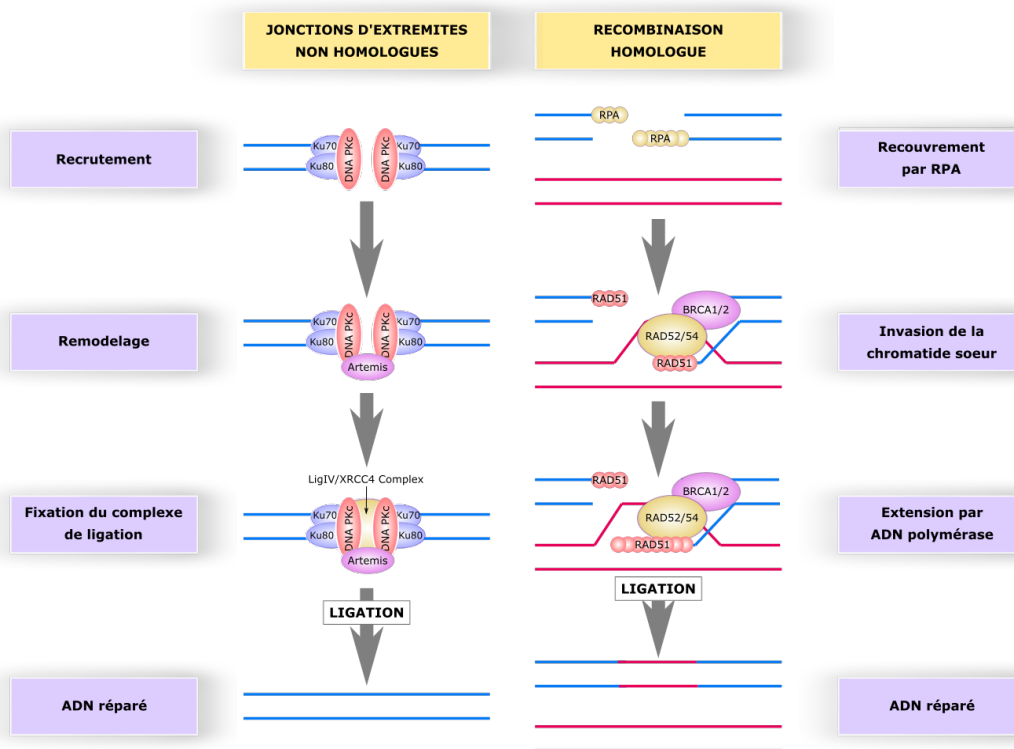


Figure 3. Réparation de l'ADN par les voies HR et NHEJ. L'activation d'ATM et du complexe MRN initie la réparation de l'ADN par deux mécanismes. La jonction d'extrémités non homologues débute par l'attachement de Ku70/Ku80 puis de DNA-PKc sur les berges de la CDB. Artémis permet le remodelage des extrémités de l'ADN qui sont ensuite ligués par le complexe LigIV/XRCC4. La recombinaison homologue commence par le remodelage des extrémités de la cassure pour produire un ADN simple-brin de chaque côté immédiatement recouvert de RPA. Ceux-ci sont remplacés par Rad51, qui conjointement avec Rad52, Rad54, BRCA1 et BRCA2, permet l'invasion de la chromatide sœur, qui sert de modèle à l'ADN polymérase. Après extension, les berges de la CDB sont rejointes par ligation. (Inspiré de Czornak et al, 2008).

La réparation par HR est un processus de réparation fidèle, qui utilise la chromatide sœur comme matrice pour restaurer la séquence initiale de l'ADN. Elle se produit pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire, lorsque les chromatides sœurs sont disponibles.

Après la formation du complexe MRN et l'activation ATM, la protéine MRE11 fixe les protéines CTP1 et CTIP, présentes uniquement en phases S et G2, qui activent alors la fonction nucléase de MRE11 ([Takeda et al, 2007](#)). MRE11 excise une partie d'ADN simple-brin de 5' vers 3' de part et d'autre de la cassure, dénudant une partie d'ADN simple-brin qui est immédiatement recouverte par des protéines RPA. Ces protéines sont ensuite remplacées par les recombinaisons RAD51 qui interagissent avec RAD52, RAD54, BRCA1 et BRCA2, et envahissent la chromatide sœur à la recherche de la séquence homologue. Une fois la séquence trouvée, les extrémités simple-brin de la cassure se retrouvent hybridées à leur homologue intact. Une polymérase étend alors ces extrémités et une ligase permet de restaurer la continuité de l'ADN.

La réparation par NHEJ est un processus sujet aux erreurs, elle permet d'assurer la continuité de l'ADN endommagé sans restaurer la séquence initiale. Par conséquent elle peut entraîner des pertes de nucléotides, voire des translocations ou des fusions. Elle se produit pendant les phases G0, G1, et M du cycle cellulaire lorsque les chromatides sœurs ne sont pas disponibles. Après la formation du complexe MRN et l'activation d'ATM, MRE11 recrute KU70 et KU80 ([Goedecke et al, 1999](#)). Ces protéines forment un hétérodimère qui se lie aux extrémités de la cassure et recrutent le complexe DNA-PKc qui lie également les extrémités de la cassure et phosphoryle Artémis. Celle-ci permet de remodeler les deux extrémités de la CDB pour les rendre concordantes, puis la ligase IV accompagnée de son cofacteur XRCC4 permettent de restaurer la continuité de l'ADN ([van Gent et van der Burg, 2007](#)).

ii. ATM induit l'arrêt du cycle cellulaire

Hormis les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN, ATM phosphoryle plusieurs autres protéines importantes qui induisent un arrêt du cycle cellulaire ([Shiloh et Ziv, 2013](#)). Par ce biais, ATM régule les points de contrôle du cycle cellulaire en phases G1, S et G2, ce qui permet à la cellule d'éviter de progresser dans le cycle avant que la réparation des CDB n'ait eu lieu.

L'activation du point de contrôle en phase G1 nécessite une activation de p53. En effet, un KO de p53 entraîne une abrogation complète de ce point de contrôle (Ko et Prive, 1996). ATM peut activer p53 de plusieurs manières, par une phosphorylation directe (Siliciano et al, 1997), par une phosphorylation indirecte passant par CHK2 (Chehab et al, 2000) et par une phosphorylation de MDM2 permettant de lever son inhibition sur p53 (Maya et al, 2001). L'activation de p53 augmente l'expression de P21, entraînant l'inhibition du complexe Cycline E/CDK2 nécessaire pour la transition vers la phase S (Roos et Kaina, 2006).

L'activation du point de contrôle en phase S nécessite une activation d'ATM. En effet, les cellules déficientes en ATM sont incapables d'initier ce point de contrôle (Painter et Young, 1980). Dans ce contexte, ATM phosphoryle CHK2 qui phosphoryle CDC25A alors dégradée par le protéasome (Falck et al, 2001). CDC25A est nécessaire pour activer le complexe Cycline A/CDK2, qui ne peut plus déclencher les origines de réplication, bloquant ainsi la cellule en phase S (Donaldson et Blow, 1999).

L'activation du point de contrôle en phase G2 repose principalement sur l'activation d'ATR (Liu et al, 2000), une autre protéine de réparation de la même famille qu'ATM. Cependant, des cellules déficientes en ATM irradiées en phase G2 se montrent peu capables d'initier ce point de contrôle, montrant qu'ATM y joue tout de même un rôle important (Beamish et Lavin, 1994). Dans ce contexte, ATM phosphoryle CHK2 qui phosphoryle CDC25C qui se lie alors à la protéine 14-3-3. Le complexe CDC25C/14-3-3 est séquestré dans le cytoplasme et ne peut plus activer le complexe Cycline B/CDK2, empêchant ainsi la cellule de continuer en mitose.

iii. ATM induit l'apoptose en cas de réparation impossible

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, important dans le développement, la réponse au stress, l'homéostasie tissulaire et le système immunitaire. Il existe deux voies apoptotiques principales : la voie intrinsèque à la cellule, et la voie extrinsèque nécessitant l'activation de récepteurs de mort. ATM active la voie intrinsèque en cas de dommages sévères de l'ADN, permettant d'éliminer la cellule devenue potentiellement dangereuse pour l'organisme.

Quelle que soit l'étape du cycle cellulaire, le déclenchement de l'apoptose par ATM repose sur l'activation de p53. Lorsque les CDB sont peu nombreuses, ATM phosphoryle une petite quantité de p53 suffisante pour contribuer à l'arrêt du cycle. Lorsque les CDB sont nombreuses, ATM phosphoryle une quantité considérable de p53 qui transactivent des gènes pro-apoptotiques tels que BAX et PUMA (Roos et Kaina, 2006). L'accumulation de p53 favorise l'oligomérisation de BAX et BAK et leur translocation mitochondriale, tout en inhibant les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL (Amaral, 2010). Les protéines pro-apoptotiques ainsi activées perméabilisent la membrane mitochondriale libérant le cytochrome C. Celui-ci s'associe à APAF1 et à la caspase 9 formant l'apoptosome (Pradelli et al., 2010). La caspase 9 conduit à l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 qui initient la condensation de la chromatine, le désassemblage du noyau et le bourgeonnement de la membrane caractéristique de l'apoptose. Fait intéressant, ATM est clivée très précocement par la caspase 3 pour éviter une signalisation de réponse aux CDB inutile lors de la fragmentation de l'ADN (Smith et al., 1999). L'accumulation de p53 transactive également le récepteur de mort FAS, suggérant un rôle d'ATM dans la voie extrinsèque, mais les articles sont peu nombreux et contradictoires (Ivanov et al., 2009 ; Stagni et al., 2008).

iv. ATM intervient dans le remodelage de la chromatine

La chromatine est constituée d'un enchainement de nucléosomes, eux-mêmes composés de protéines histones qui ont pour fonction de protéger l'ADN. La chromatine est habituellement décrite selon son état transcriptionnel. L'euchromatine est une chromatine faiblement condensée et transcriptionnellement active, tandis que l'hétérochromatine est une chromatine fortement condensée et transcriptionnellement inactive. Lors d'une CDB, la réparation de l'ADN se fait de concert avec la modification de l'organisation de la chromatine pour maximiser l'efficacité de la réparation. ATM permet l'activation de protéines impliquées dans des modifications épigénétiques et dans le remodelage de la chromatine, permettant d'atténuer les barrières de structure pour faciliter l'accès aux protéines de réparation, et de réprimer les processus qui pourraient interférer avec la réparation, tels que la réplication ou la transcription.

Lorsqu'une CDB a lieu dans l'hétérochromatine, ATM phosphoryle la protéine KAP1 ([Chiu et al, 2017](#)) qui perturbe le complexe NURD, impliqué dans le remodelage et la désacétylation des histones, ce qui provoque son départ de l'hétérochromatine ([Stanley et al, 2013](#)). Cet événement est associé à la relaxation de la chromatine permettant de faciliter l'accès aux protéines de réparation ([Ziv et al, 2006](#)).

Lorsqu'une CDB a lieu dans l'euchromatine, ATM active les E3-ubiquitines-ligases RNF8 et RNF168 qui ubiquitinent les histones H2A à proximité. Cela bloque la décompaction de la chromatine accompagnant l'activité de la Polymérase II et inhibe ainsi la transcription des gènes au voisinage ([Shanbhag et al., 2010](#)).

Un regard particulier doit être consacré à la chromatine nucléolaire, car il s'agit de l'euchromatine la plus fortement transcrite du génome. Lorsqu'une CDB a lieu au sein de l'ADN ribosomal, ATM va conduire, par l'intermédiaire de NBS1, au blocage de l'ARN polymérase I et à sa sortie du nucléole ([Harding et al, 2015](#)). ATM va également induire une réorganisation spatiale du nucléole pour placer les CDB à la périphérie, dans des structures appelées « caps nucléolaires », permettant de faciliter l'accès aux protéines de réparation ([Shav-Tal et al., 2005](#)).

c. Implications d'ATM dans d'autres voies de signalisation

La plupart des études portant sur ATM se concentrent sur son implication dans la réponse aux CDB. Ces études sous-entendent l'existence d'une dichotomie entre une protéine ATM « dormante » en conditions physiologiques et une protéine ATM qui répond de manière explosive dans les secondes suivant la CDB. Cependant, des preuves s'accumulent sur un rôle continu d'ATM dans les processus de signalisation cellulaire non limités aux seuls dommages de l'ADN, et dont certaines de ses fonctions sont cytoplasmiques ([Shiloh et Ziv., 2013](#)).

i. Stress oxydatif

ATM intervient dans la physiologie mitochondriale (Ambrose et al, 2007). Les lignées lymphoblastoïdes déficientes en ATM ont une augmentation du nombre de mitochondries, une diminution de la respiration mitochondriale et une augmentation de la production basale de ROS par la chaîne respiratoire. Une étude plus récente sur des thymocytes de souris suggère que cette augmentation du nombre de mitochondries n'est pas due à une augmentation de la biogenèse mitochondriale mais à une diminution de la mitophagie (Valentin-Vega et al, 2012). L'ajout d'antioxydant ou la réexpression d'ATM permettent de normaliser la respiration mitochondriale (Ambrose et al, 2007). ATM favorise donc la mitophagie et la gestion des ROS mitochondriaux.

ATM joue un rôle similaire dans la régulation des peroxysomes. Ces organites permettent l'oxydation des acides aminés et des acides gras et sont donc aussi source de ROS. Tout comme la mitochondrie, ils expriment la catalase et la superoxyde dismutase pour prendre en charge les ROS. Le peroxysome apparaît comme étant très lié à la mitochondrie et inversement. Une dysfonction peroxysomale peut causer des anomalies mitochondriales (Lismont et al., 2015) et des altérations de l'état redox du peroxysome sont susceptibles d'avoir une incidence sur l'activité redox mitochondriale (Schrader et al., 2015). En condition basale, ATM lie Pex5, une protéine de la membrane peroxysomale, qu'elle phosphoryle en cas de stress oxydatif. Suite à cette phosphorylation, Pex5 est ubiquitinée puis reconnue par l'adaptateur de l'autophagie p62, qui cible alors le peroxysome vers la pexophagie. ATM est donc aussi impliquée dans la pexophagie et la régulation des ROS peroxysomaux.

ATM intervient également dans le maintien de l'équilibre redox cellulaire en favorisant une réponse antioxydante par la voie des Pentoses-Phosphates (PP). Cette voie permet la synthèse du NADPH qui est requis pour la synthèse du glutathion, molécule la plus importante pour la détoxification des ROS de la cellule. ATM permet la phosphorylation et l'activation de la G6PDH qui est l'enzyme limitante dans la voie des PP (Cosentino et al, 2011). Les souris déficientes en ATM possèdent un niveau réduit en NADPH et en synthèse de glutathion.

ii. Métabolisme

ATM modifie également le métabolisme de la cellule en réponse au stress oxydatif. ATM est responsable de l'inhibition de mTORC1 par une cascade de signalisation dans des lignées lymphoblastoïdes (LCL pour *lymphoblastoid cell lines*) issues de donneurs sains en présence d'H₂O₂ (Alexander et al, 2010). L'inhibition de mTORC1 conduit à l'autophagie, qui permet de recycler les organelles de la cellule et de récupérer des nutriments issus de la dégradation de ces organelles en cas de stress. Au contraire, des LCL déficientes en ATM et incubées en présence d'H₂O₂ ne sont pas capables d'induire l'inhibition de mTORC1. L'intervention de la mitochondrie est nécessaire pour l'inhibition de mTORC1 par ATM, même si la voie précise n'a pas encore été caractérisée (Moria et al, 2014).

ATM intervient dans le contrôle de l'homéostasie du glucose en régulant la voie de réponse à l'insuline. ATM phosphoryle le répresseur de traduction 4EBP1 en réponse à l'insuline. 4EBP1 est un inhibiteur réversible de eIF4E, un composant du complexe d'initiation de la traduction, et sa phosphorylation entraîne sa dissociation de eIF4E favorisant ainsi la synthèse des protéines (Yang et Kastan, 2000). ATM répond également à l'insuline en activant la protéine kinase AKT, qui permet l'augmentation de l'expression du récepteur GLUT4 à la membrane, et améliore ainsi l'absorption du glucose dans la cellule (Xu et al, 2012).

4. PREDISPOSITION DES PATIENTS ATTEINTS D'AT AUX NEOPLASIES

L'hypothèse d'une association entre AT et l'incidence accrue de cancers n'est pas récente et date de la caractérisation de la maladie par Boder et Segwick en 1963. Cette association a ensuite été confirmée en 1964 (Raymond et al., 1964), puis l'incidence des cancers au début de l'âge adulte a été estimée aux alentours de 10% à 15% dont plus de 80% d'hémopathies malignes (Kersey et al., 1973 ; Spector et al., 1982 ; Taylor et al., 1996). L'incidence accrue des cancers chez les patients atteints d'AT est due à la réparation défectueuse des CDB, qui provoque une instabilité génomique conduisant à des délétions, des translocations ou des fusions de gènes.

Ces cancers concernent principalement les lignées lymphocytaires, sans doute en raison de la nécessité de l'utilisation de CDB pour la maturation des gènes des immunoglobulines. En effet environ 10% des patients atteints d'AT développent une expansion clonale de lymphocytes T qui possèdent des réarrangements chromosomiques et peuvent évoluer vers des leucémies et lymphomes T ([Stoppa-Lyonnet et al., 1998](#)). De plus, de multiples hémopathies lymphoïdes B sont également associées à des mutations acquises d'ATM, telles que le lymphome à cellules du manteau, le lymphome diffus à grandes cellules B et les lymphomes de Hodgkin, montrant que le tissu lymphoïde est particulièrement sensible à l'inactivation d'ATM. L'utilisation de la voie AEJ dans le cadre de l'ontologie B et T, voie qui génère de multiples erreurs, explique également pourquoi les patients atteints d'AT sont principalement susceptibles à ce type de néoplasies ([Pan et al., 2002](#)).

Une description précise des types de néoplasies des patients atteints d'AT et de leur incidence a été réalisée par notre équipe, à travers une étude rétrospective des cancers de 279 patients atteints d'AT du registre du Centre National de Référence pour les Déficits Immunitaires Primaires (CEREDIH) ([Suarez et al., 2015](#)). Près de 90% des complications néoplasiques observées au cours de l'AT correspondaient à des hémopathies malignes. De plus, la grande majorité de ces dernières étaient représentées par des lymphomes non hodgkiniens B agressifs (B diffus à grandes cellules et Burkitt) ou par des lymphomes de Hodgkin. Près de la moitié des lymphomes non hodgkiniens B, et la totalité des lymphomes de Hodgkin qui ont pu être étudiés étaient associés à l'EBV en immunohistochimie et en hybridation *in situ*.

La fréquence des néoplasies associées à l'EBV chez les patients atteints d'AT a d'abord été décrite comme étant une conséquence de l'immunodéficiences ([Saemundsen et al., 1981](#)). Il a ensuite été suggéré que les lymphocytes des patients atteints d'AT avaient par eux-mêmes une susceptibilité accrue à la transformation par l'EBV ([Okano et al., 1993](#)). Cette prévalence accrue de tumeurs malignes associées à l'EBV pourrait être due, en plus de l'immunodéficiences, à une régulation perturbée de la latence du virus.

5. CYCLE DE VIE DU VIRUS D'EPSTEIN BARR

a. Un virus humain associé à de multiples néoplasies

L'EBV appartient à la famille des Herpesviridae, une famille de grands virus enveloppés à ADN double-brin, et a été identifié pour la première fois dans le lymphome de Burkitt dans les années 1960 ([Epstein et al., 1964](#)). Tous les herpesvirus ont deux phases distinctes d'infection, lytique et latente. L'EBV établit un cycle lytique dans les cellules épithéliales et un cycle latent dans les lymphocytes B. Son génome est composé d'une double hélice d'ADN de 172kB codant pour 85 gènes, dont 76 gènes interviennent dans sa réplication lytique et 9 dans le contrôle de sa latence ([Amon et Farell, 2005](#)). Cet ADN est entouré d'une nucléocapside recouverte d'un tégument et enveloppée d'une membrane composée de lipides et de glycoprotéines de surfaces essentielles à l'infection de la cellule ([Odumade et al, 2011](#)). Son diamètre est de l'ordre de 122 à 180 nm.

L'infection à EBV est associée au développement de tumeurs d'origine lymphoïde ou épithéliale (Tableau 1), notamment le lymphome de Burkitt et le carcinome gastrique, le lymphome de Hodgkin et le carcinome du nasopharynx, ainsi que les lymphomes associés au syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et à la transplantation ([Suarez et al., 2006](#)). Ces néoplasies associées à EBV sont très différentes à la fois sur le plan histologique et moléculaire. Elles dérivent de différents stades de l'infection virale et reflètent l'expression dynamique des gènes viraux. Dans le lymphocyte B, ces stades de l'infection virale sont intimement liés aux stades de différenciation du lymphocyte.

Lymphoid lesions	References
Burkitt's lymphoma	(Epstein et al, 1964)
AIDS-related lymphoproliferative disorder	(Ziegler et al, 1982)
Post transplant lymphoproliferative disorder	(Starzl et al, 1984)
Diffuse large B-cell lymphoma	(Weiss et al, 1988)
Angioimmunoblastic T cell lymphoma	(Weiss et al, 1992)
Hodgkin's lymphoma	(Hamilton-Dutoit et Pallesen, 1992)
NK and T cell lymphoma	(Tao et al, 1995)
Non-lymphoid lesions	References
Nasopharyngeal carcinoma	(Andersson-Anvret et al, 1977)
Squamous cell carcinoma	(Purtilo et al, 1984)
Gastric adenocarcinoma	(Shibata et al, 1991)
Salivary gland carcinoma	(Raab-Traub et al, 1991)
Leiomyosarcoma	(van Gelder et al, 1995)

Tableau 1 : Tumeurs malignes lymphoïdes et non lymphoïdes associées à l'EBV. Depuis les années 1960, un grand nombre de cancers ont été progressivement associés à l'EBV. Pour chaque cancer, la première découverte d'implication de l'EBV est donnée dans la référence associée.

b. Etablissement de la latence virale

La transmission de l'EBV d'un hôte à un autre s'effectue par la salive, le plus souvent de manière asymptomatique pendant l'enfance (Thorley-Lawson et Allday, 2008). Le premier site d'infection est l'épithélium de l'oropharynx où l'EBV entre en cycle lytique. Il utilise la machinerie cellulaire pour se répliquer et produire de multiples virions, entraînant la mort de la cellule. Ces virions diffusent dans les tissus lymphoïdes sous-jacents, notamment au niveau de l'anneau de Waldeyer. Ils infectent alors les lymphocytes B suite à l'interaction de la glycoprotéine de l'enveloppe virale gp350 avec le récepteur hôte CD21. Le CD21 est un récepteur du fragment C3d du complément (Nemerow et al, 1985). Ce récepteur n'est pas restreint aux lymphocytes B, des molécules identiques ou apparentées ont été trouvées dans les cellules T et les cellules épithéliales (Timens et al, 1991 ; Hedrick et al, 1992). Néanmoins, l'infection par EBV a été décrite dans des cellules CD21 négatives, suggérant l'existence d'un autre mode d'infection indépendant de ce récepteur.

La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'hôte implique trois autres glycoprotéines, à savoir gp85, gp25 et gp42 (Li et al, 1995). L'une de ces glycoprotéines, gp42, se lie en outre au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et favorise l'infection des lymphocytes B (Li et al, 1997). Une fois l'enveloppe virale fusionnée avec la membrane de l'hôte, le génome de l'EBV migre vers le noyau puis se circularise sous forme épisomale (Hurley et Thorley-Lawson, 1988), ce qui déclenche l'expression virale du promoteur Wp (Woisetschlaeger et al., 1990). Des facteurs cellulaires comme PAX5, un facteur de transcription spécifique du lymphocyte B, viennent transactiver le promoteur Wp (Tierney et al., 2000) pour produire les protéines virales EBNA-2 et EBNA-LP (Alfieri et al., 1991).

EBNA-2 est un activateur transcriptionnel qui interagit avec la cible de la voie Notch, RBP-Jk, suggérant qu'elle agit comme un homologue fonctionnel d'un récepteur Notch activé (Zimmer-Strobl et al, 1994). Elle remplace les répresseurs transcriptionnels associés à RBP-Jk comme SIN3A, HDAC1 ou HDAC2, et recrute des activateurs transcriptionnels. EBNA-LP coopère avec EBNA-2 pour faciliter l'activation transcriptionnelle de RBP-Jk. Une fois activé, RBP-Jk va permettre la transcription de multiples cibles, dont Myc, conduisant à la prolifération de la cellule (Young et Rickinson, 2004).

EBNA-2 est aussi un facteur de transcription et se fixe sur le promoteur Cp pour produire les protéines virales EBNA-3A, 3B, 3C, EBNA-1, et sur un promoteur spécifique pour produire LMP-1, 2A et 2B. Les protéines EBNA-3 fixent alors le promoteur Qp pour stimuler leur propre synthèse. En plus des protéines virales, de nombreux ARN non-codants sont produits, dont des micro-ARNs et les ARN viraux EBERs. L'expression de ces neuf protéines virales et des ARN non-codants conduisent à la prolifération et à l'immortalisation de la cellule et est nommée stade de latence de type III.

De manière intéressante, les cellules infectées par EBV exprimant l'ensemble complet des neuf protéines de latence virale se trouvent principalement chez les individus immunodéprimés, tels que les patients transplantés ou les patients au stade SIDA de l'infection par le VIH (Raab-Traub, 2007). Les tumeurs associées à une latence de type III sont les lymphomes diffus à grandes cellules B et les syndromes lymphoprolifératifs post transplantation qui peuvent survenir respectivement chez les patients au stade SIDA (Bibas et Antinori, 2009) ou transplantés (Tse and Kwong, 2015).

c. Evolution de la cellule infectée *in vivo*

i. Une puissante réponse immunitaire

Les cellules les plus importantes pour contrôler l'expansion des lymphocytes B infectés par EBV sont les cellules T cytotoxiques (CTL). En effet, l'infection primaire par EBV chez les jeunes adultes conduit à une mononucléose infectieuse comportant une expansion massive de CTL (Callan et al., 1996). Les protéines virales EBNA-3 et, dans une moindre mesure, EBNA-2 induisent une réponse CTL puissante (Khanna et al., 1992) qui élimine une grande proportion de cellules infectées.

La réponse des cellules NK est également importante dans le contrôle de l'infection primaire (Chijioke et al., 2013). Ces cellules sont les premières à agir et sont capables de détruire les cellules infectées sans avoir été sensibilisées à un antigène spécifique. Elles produisent également des molécules ayant une activité antivirale comme l'IFN γ . Une réponse humorale est également générée, d'abord contre les antigènes du cycle lytique puis contre les antigènes du cycle latent, mais joue un rôle limité dans le contrôle de l'infection à EBV (Tangye et al., 2017).

ii. Vers une restriction progressive de la latence

La liaison des protéines EBNA-3 à RBP-Jk permet le recrutement de corépresseurs et module l'expression des transcrits cellulaires et viraux transactivés par EBNA-2 (Robertson et al., 1996). Le lymphocyte B infecté perd progressivement l'expression d'EBNA-2, EBNA-LP et des EBNA-3. Il échappe ainsi au contrôle immunitaire et migre vers les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, pour subir les étapes de maturation classique du lymphocyte B. Cette expression restreinte des gènes de latence est nommée stade de latence de type II. Les tumeurs associées à une latence de type II sont les lymphomes de Hodgkin et les carcinomes du Nasopharynx (Brooks et al. 1992, Rowe et al., 1992).

Dans une situation normale, le lymphocyte B ayant rencontré l'antigène arrive au niveau du centre germinatif. Il va subir le processus d'hypermutation somatique pour moduler l'affinité de ses immunoglobulines à l'antigène. Le lymphocyte B présente alors son récepteur B à l'antigène (BCR pour *B-cell receptor*) édité à la cellule folliculaire dendritique qui présente l'antigène. Si le BCR a une faible affinité pour l'antigène, le lymphocyte B recevra des signaux de mort, et si l'affinité est grande il recevra des signaux de survie. Ce lymphocyte B internalise alors l'antigène et le présente sur CMH II à un lymphocyte T helper folliculaire. Ce lymphocyte s'active, exprime le CD40 et sécrète diverses cytokines qui activent le lymphocyte B. Celui-ci subit alors le processus de commutation de classe pour définir sa classe définitive et se différencie en plasmocyte ou en lymphocyte B mémoire (Tangye and Good, 2007).

Les protéines virales LMP1 et LMP2 répliquent les signaux induits dans les lymphocytes B lors de la réaction du centre germinatif et provoquent leur prolifération. LMP1 imite le signal du CD40 activé (Uchida et al., 1999) et induit des EBV-LPD chez la souris transgénique (Kulwichit et al., 1998). LMP2 imite le signal du BCR activé par l'antigène (Miller et al., 1998) et permet la différenciation des lymphocytes B même en l'absence de signalisation normale du BCR (Caldwell et al., 1998). Le lymphocyte B infecté n'a alors pas besoin de "réussir" son hypermutation somatique pour avoir un signal de survie. Il échappe aux signaux de mort et se différencie en B mémoire (Babcock et al., 1998).

Dans un même temps, EBV restreint encore sa latence pour n'exprimer que EBNA-1 et les ARN non-codants, appelée stade de latence de type 1. EBNA1 permet l'attachement de l'épisome viral à la chromatine nucléaire et est nécessaire pour la ségrégation des épisomes viraux dans les cellules filles au cours de la mitose (Kanda et al., 2001). Les tumeurs associées à une latence de type I sont les lymphomes de Burkitt et les carcinomes gastriques. L'EBV persiste ensuite indéfiniment dans les lymphocytes B mémoire (Babcock et al., 1998).

Lorsque ces cellules infectées se différencient en plasmocytes suite à une rencontre avec leur antigène, le facteur de transcription XBP-1 alors induit active l'expression de BZLF1, une protéine virale suffisante pour induire le cycle lytique (Sun et Thorley-Lawson, 2013). Les virions sont ensuite libérés dans la circulation sanguine et peuvent infecter de nouveau l'épithélium de l'oropharynx pour perpétuer le cycle infectieux (Figure 4).

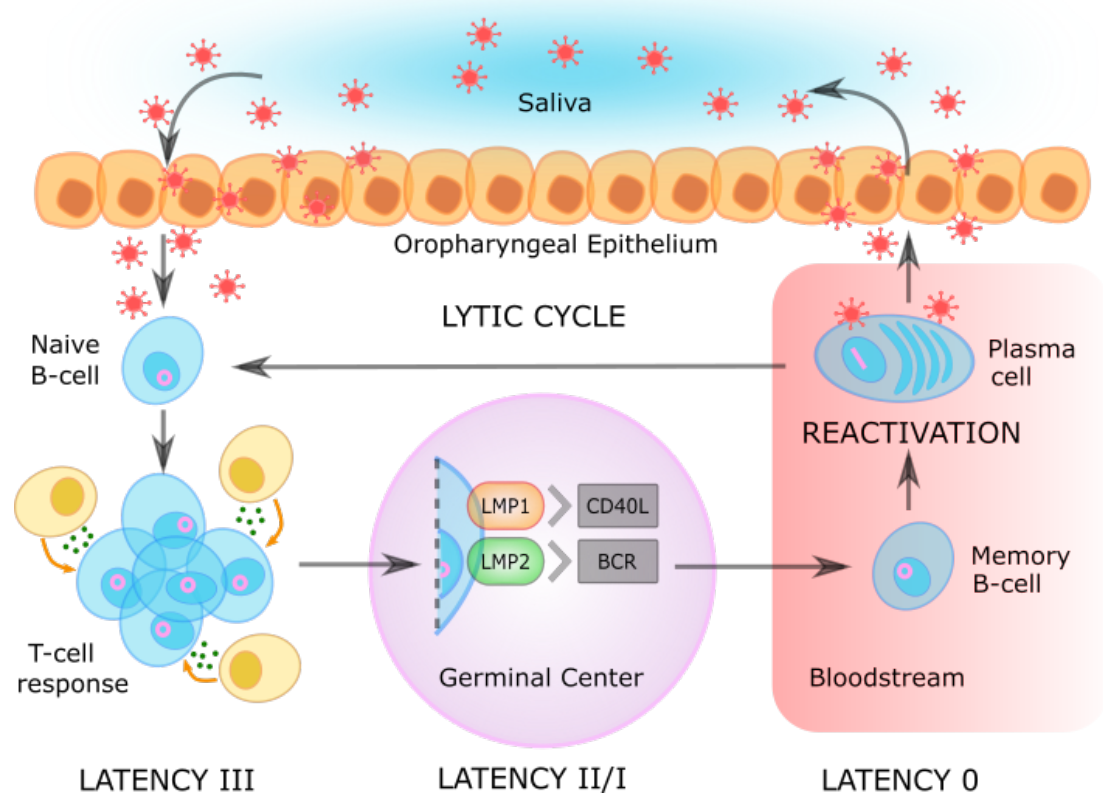


Figure 4 : Cycle de vie de l'EBV. L'EBV procède à une répllication lytique dans l'épithélium de l'oropharynx puis entre en latence dans le lymphocyte B naïf. L'ADN viral se circularise sous forme épisomale et induit la prolifération des cellules infectées qui sont rapidement contrôlées par la réponse T cytotoxique. Les cellules échappant à cette réponse migrent vers le centre germinatif, où elles vont progressivement restreindre l'expression de leurs gènes de latence en passant d'une latence III à une latence II puis I en acquérant un phénotype B mémoire. Les protéines virales LMP1 et LMP2 miment respectivement les signaux donnés par le CD40 et le BCR activé et permettent de recevoir des signaux de survie dans le centre germinatif. Les lymphocytes B mémoire infectées représentent le réservoir de l'EBV. De manière épisodique, l'EBV peut se réactiver lors de différenciation des B mémoires en plasmocytes et réactiver le cycle lytique. L'épithélium de l'oropharynx peut de nouveau être infecté et libérer de l'EBV dans la salive, le rendant à nouveau transmissible. (Adapté de Thorley-Lawson et Allday, 2008 ; Khanna et al., 1992 ; Uchida et al., 1999 ; Miller et al., 1998 ; Babcock et al., 1998 ; Sun et Thorley-Lawson, 2013)

À tout moment, environ 250 cellules subissent une répllication lytique dans l'oropharynx d'un adulte sain (Hawkins et al. 2013). Au sein de ces cellules, seules 10% des virus ont un cycle lytique complet avec l'expression d'antigènes très précoces, précoces et tardifs, entraînant la libération de particules infectieuses (Thorley-Lawson 2015). Cela indique que, bien que BZLF1 soit exprimé, la plupart de ces virus ont un cycle abortif qui ne conduit pas à l'expression d'antigènes de phase tardive et semble dépendre de l'état de méthylation de l'ADN viral (Bhende et al. 2005).

Ce cycle abortif a également été observé dans les cas d'EBV-LPD, tels que les lymphomes de Burkitt (Kelly et al. 2009) ou les lymphomes diffus à grandes cellules B (Cohen et al. 2018). BZLF1 induit de nombreux gènes viraux ayant des activités anti-apoptotiques ou immunomodulatrices, permettant ainsi à la cellule lytique d'éviter la mort cellulaire (Altmann et Hammerschmidt 2005). Ces gènes sont également activés pendant le cycle abortif et des preuves croissantes suggèrent que ces gènes pourraient contribuer à la lymphomagenèse (Morales-Sánchez et Fuentes-Panana 2018). Des modèles d'infection à EBV ont été développés récemment à partir de souris humanisées (Rongvaux et al. 2013). Après l'infection par EBV, 50% de ces souris développent des EBV-LPD (Antsiferova et al. 2014), principalement composés de lymphocytes B infectés par EBV en latence de type III (Strowig et al. 2009). Lorsque le virus EBV est muté pour BZLF1, ce taux diminue à 15%, ce qui montre l'importance de BZLF1 pour la lymphomagenèse (Morales-Sánchez et Fuentes-Panana 2018).

Contrairement aux tumeurs en latence de type III qui se développent surtout chez les patients immunodéprimés, les tumeurs en latence de type II et I apparaissent comme étant associées à des facteurs de risques génétiques et environnementaux. En Afrique, la carte d'incidence des lymphomes de Burkitt endémique se superpose à celle de l'infection par le Paludisme, suggérant une forte association entre l'infection par EBV et par le Plasmodium Falciparum (Hämmerl et al, 2019). Le Paludisme génère une hyperplasie des lymphocytes B et une instabilité génomique qui augmente le risque de lymphomes (Robbiani et al, 2015). A cela s'ajoute le fait que les mamans pré-mastiquent traditionnellement les aliments pour leurs enfants en bas âge et leurs transmettent ainsi un inoculum massif d'EBV (Magrath, 2009). Le carcinome du Nasopharynx est quant à lui prédominant dans les régions d'Asie du Sud Est et d'Afrique du Nord, sans doute favorisé par une alimentation spécifique à ces régions (Busson et al, 2004). La pollution industrielle et le tabagisme s'avèrent être également des facteurs de risque. Enfin, des études d'associations ont montré qu'il existe des gènes de prédisposition localisés dans le CMH ou à proximité pour le carcinome du Nasopharynx (Tse et al, 2009) ainsi que pour le lymphome de Hodgkin (Urayama et al, 2012). Certains variants de CMH pourraient présenter plus ou moins bien l'EBV (Feng, 2013).

d. Evolution de la cellule infectée *in vitro*

i. Génération de lignées immortalisées

Notre compréhension des changements d'expression des gènes de latence de l'EBV provient principalement de l'infection de lymphocytes B primaires humains *in vitro* par EBV (Kieff et Rickinson, 2006). En effet, l'EBV est un des plus puissants agents immortalisant *in vitro*.

Tout en ayant des limites (Thorley-Lawson et Allday, 2008), ce système permet d'étudier le programme de latence de l'EBV avec des concentrations physiologiques de protéines virales, d'ARN viraux non-codants et de micro-ARN. Dans ce système, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC pour *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sont infectées par EBV en présence d'immunosuppresseurs T, tels que la cyclosporine A (Borel et al., 1977). Les lymphocytes B infectés se mettent alors à proliférer pour former une lignée continue immortalisée, appelée lignée lymphoblastoïde. Cette lignée exprime l'ensemble des neuf gènes de latence et des ARN viraux non-codants et est donc en stade de latence de type III. De plus elle développe des tumeurs après injection dans des souris Nude, démontrant son caractère tumoral.

ii. Une faible efficacité de transformation

Cependant, seules 3% des PBMCs infectées *in vitro* par l'EBV deviennent des lymphoblastes immortalisés (Henderson et al, 1977, Sugden et Mark, 1977). Il y a donc un mécanisme suppresseur de tumeur intrinsèque à la cellule qui contrôle cette transformation.

Peu de temps après l'infection, la protéine ATM est activée en concomitance avec EBNA-LP, un gène de latence de l'EBV exprimé de manière précoce. Cette période d'activation d'ATM correspond à la période d'hyperprolifération des lymphocytes B infectés et aboutit à la mort de la majorité des lymphocytes. Au bout de 14 jours il ne reste plus que 20% de cellules en prolifération parmi les PBMCs. Si on traite en revanche les cellules par un inhibiteur d'ATM en continu, ce pourcentage passe à plus de 50%, montrant qu'ATM permet une restriction de la transformation induite par EBV (Nikitin et al, 2010).

6. MECANISMES SOUS-JACENTS A LA SENSIBILITE DE L'AT A L'EBV

a. Dysfonction immunitaire au cours de l'AT

Les patients atteints d'AT peuvent présenter une lymphopénie ainsi qu'une carence en immunoglobuline A (IgA) qui ne semblent pas impacter la réponse immune ([Pashankar et al., 2006](#)). Bien que des infections virales ou opportunistes sévères ne soient pas fréquentes ([Nowak-Wegrzyn et al., 2004](#)), les patients atteints d'AT présentent des infections bactériennes sino-pulmonaires récurrentes qui semblent augmenter avec l'âge ([McGrath-Morrow et al., 2010](#)). Cela pourrait s'expliquer par le déficit en IgA qui est associé à un risque accru de rhinosinusite chronique ([Ocampo et al., 2013](#)), par le déficit en IFN γ produit par les lymphocytes T ([Reichenbach et al., 2006](#)), mais aussi par la neurodégénérescence progressive : les patients atteints d'AT ont des problèmes de mastication et de déglutition qui s'aggravent avec l'âge, conduisant à une inhalation involontaire de nourriture qui favorise les infections pulmonaires ([Lefton-Greif et al., 2000](#) ; [Nowak-Wegrzyn et al., 2004](#)).

Comme vu précédemment, les lymphocytes NK jouent également un rôle important dans le contrôle de l'infection à EBV, mais leur nombre et leur fonction chez les patients atteints d'AT semblent normaux ([Palendira et Rickinson, 2015](#)). Ces patients présentent une expansion de la population CD56 Bright (CD3- CD16 + CD56 +) importante pour la production de cytokines, qui ne suffit toutefois pas à surmonter le défaut de production d'IFN γ ([Reichenbach et al., 2006](#)).

Plusieurs observations suggèrent que les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle dans le contrôle des infections virales. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ représentent 1 à 10% des lymphocytes T totaux et reconnaissent une gamme distincte de cibles antigéniques ([Vantourout et Hayday, 2013](#)). La perfusion de pamidronate (connu pour activer les lymphocytes T $\gamma\delta$) chez les souris humanisées a significativement réduit les lymphoproliférations EBV ([Xiang et al., 2014](#)). Cependant, les patients atteints d'AT semblent avoir une augmentation de la population de lymphocytes T $\gamma\delta$ ([Carbonari et al., 1990](#)).

En résumé, les défauts immunologiques préalablement décrits chez les patients atteints d'AT ne semblent pas suffisants pour expliquer l'augmentation de l'incidence des lymphomes associés à EBV.

Certaines études ont également suggéré un rôle pour les lymphocytes NK-T invariants (iNKT) dans le contrôle de l'EBV. Ces cellules sont restreintes à la reconnaissance du CD1d, une molécule de type CMH de classe I exposant des antigènes lipidiques. Les patients présentant des mutations dans SH2D1A (codant SAP) ou dans BIRC4 (codant XIAP) ont peu ou pas d'iNKT et sont très sensibles à l'EBV. Cependant, ces mutations affectent également la fonction normale des lymphocytes T, rendant difficile de savoir si le défaut d'iNKT est responsable de la maladie (Tangye, 2014; Lopez-Granados et al., 2014). Des iNKT perfusés chez des souris immunodéficientes ayant reçu une injection de cellules transformées par EBV présente une formation tumorale réduite (Yuling et al., 2009). De même, une étude *in vitro* sur des PBMC infectées par EBV a montré une efficacité de transformation plus élevée lorsque les iNKT étaient auparavant déplétés (Chung et al., 2013). Il n'y a eu à ce jour aucune exploration complète des taux d'iNKT chez les patients AT, mais une petite étude sur 3 patients suggère que les patients atteints d'AT présentent un déficit en iNKT (Bongartz, 2017).

Alors que la plupart des patients atteints d'un DIP et ayant une sensibilité particulière à l'EBV présentent un défaut de CTL anti-EBV, d'autres patients atteints de DIP présentent une sensibilité spécifique à l'EBV par d'autres mécanismes tels que les XMEN (*X-linked immunodeficiency with Magnesium defect, EBV infection, and neoplasia* ; mutations dans MAGT1) (Chaigne-Delalande et al. 2013) et les patients ayant des mutations dans CTPS1 (Martin et al., 2014). MAGT1 permet un influx de magnésium induit par le récepteur T à l'antigène (TCR pour *T-cell receptor*) qui active les lymphocytes T (Li FY et al., 2011) et CTPS1 permet la synthèse de CTP impliquée dans l'anabolisme des acides nucléiques (Martin et al., 2014). Les lymphocytes T de ces patients peuvent répondre à une stimulation standard du système immunitaire, mais la capacité de leurs lymphocytes T à faire face au stress prolifératif intense induit par l'infection à EBV est sévèrement altérée, entraînant un déficit immunitaire spécifique à l'EBV.

b. Données probantes sur le rôle d'ATM lors de l'infection à EBV

Comme mentionné ci-dessus, il existe des preuves cliniques montrant un contrôle anormal de l'infection à EBV chez les patients atteints d'AT, sans explication équivoque d'un défaut immunitaire cellulaire associé conduisant à des EBV-LPD. Face à ce paradoxe apparent, on peut émettre l'hypothèse d'un défaut intrinsèque de la cellule entraînant une altération du contrôle de la latence de l'EBV dans les lymphocytes B des patients AT, favorisant ainsi les propriétés oncogéniques du virus. Il existe en effet des preuves démontrant l'implication d'ATM dans le cycle lytique et latent de l'EBV, comme discuté ci-dessous.

i. Lors du cycle lytique

ATM intervient dans la régulation du cycle lytique de nombreux virus, y compris EBV. Au cours du cycle viral, la réplication virale génère une grande quantité d'ADN linéaire double-brin dans le noyau, qui est reconnu comme une CDB et active ainsi les mécanismes de réparation ([Kudoh et al., 2005](#)). Il a été démontré qu'ATM et le complexe MRN se lient au génome viral et recrutent d'autres protéines telles que RPA, Rad51 et Rad52 qui favorisent la réplication du virus. Des études récentes ont rapporté une inhibition de la réplication virale après inhibition pharmacologique d'ATM ([Hau et al., 2015](#)). BGLF4, une des premières protéines virales exprimées au cours du cycle lytique, phosphoryle directement ATM et H2AX ([Yamamoto et al., 2014](#)). BGLF4 phosphoryle et active également Tip60 ([Li R et al., 2011](#)), une histone acétyltransférase, qui à son tour active ATM ([Sun et al., 2005](#)) (figure 5).

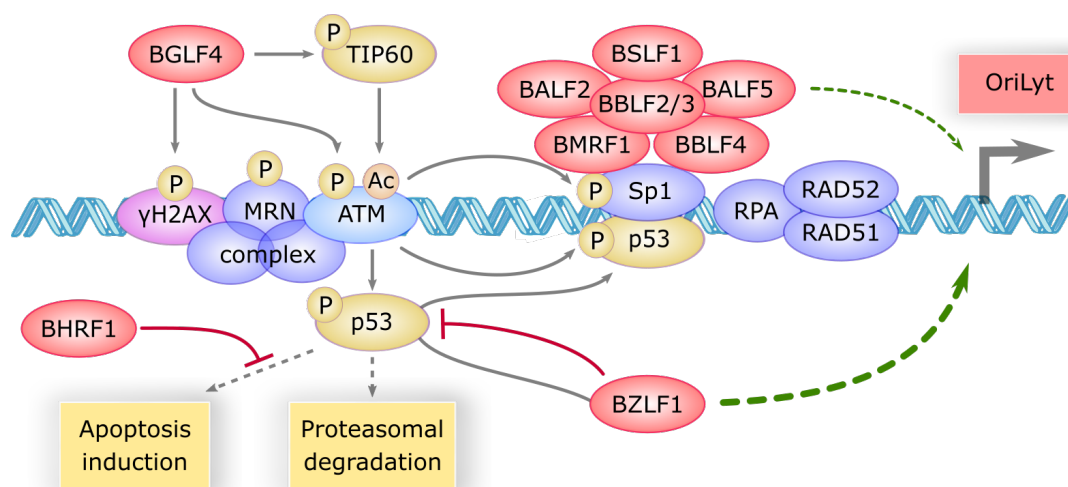


Figure 5 : Rôle central d'ATM dans le compartiment de réplication d'EBV. Dans le cycle lytique, des protéines de réponse aux dommages de l'ADN, telles que γ H2AX, le complexe MRN, ATM, SP1, RPA, RAD51 et RAD52, lient le génome viral et favorisent la réplication du virus. Les protéines virales sont indiquées en rouge. BGLF4 phosphoryle H2AX, ATM et TIP60 qui acétyle ATM pour favoriser cette réplication. ATM phosphoryle et active Sp1, qui est nécessaire pour la formation du compartiment de réplication comprenant un complexe de six protéines centrales de réplication virale : BSLF1, BALF2, BBLF2 / 3, BALF5, BMRF1 et BBLF4. ATM phosphoryle et active p53, qui est inhibée et dirigée par BZLF1 vers le compartiment de réplication. BZLF1 est un transactivateur majeur du promoteur des gènes lytiques OriLyt. p53 se lie à Sp1 et favorise l'activation d'OryLyt. p53 est régulée par dégradation protéasomale et peut induire l'apoptose, mais BHRF1 inhibe un panel de protéines pro-apoptotiques. (D'après Li R et al., 2011 ; Sun et al., 2005 ; Kudoh et al., 2005 ; Olofsson et al., 2007 ; Kudoh et al., 2009 ; Kvensakul et al., 2010 ; Yamamoto et al., 2014 ; Hau et al., 2015)

In vitro, il est possible de déclencher le cycle lytique de l'EBV en utilisant une multitude de substances, tels que les inhibiteurs HDAC, l'eau oxygénée, la 5-Azacytidine, le Bortezomib ou Nutlin3. Les mécanismes conduisant à l'activation du cycle lytique par ces molécules sont assez mal connus, mais ATM semble être impliquée car son invalidation empêche cette réactivation lytique (Kenney et Mertz, 2014 ; Hagemeyer et al, 2012).

Au cours de la réplication lytique, l'activation d'ATM permet la phosphorylation de p53 et Sp1, un facteur de transcription impliqué dans la réparation de l'ADN (Olofsson et al., 2007). Sp1 joue un rôle dans la formation du compartiment de réplication nucléaire du virus (Hau et al., 2015) où un niveau élevé de p53 est trouvé. Sp1 et p53 forment un complexe qui lie et active le promoteur BZLF1 (Kudoh et al., 2005), le principal transactivateur viral des gènes lytiques de l'EBV. D'autres protéines de réparation présentes dans ces compartiments, telles que RPA, RAD51 et RAD52, semblent également impliquées dans l'induction de BZLF1, car leur réduction réduit considérablement la réplication virale (Kudoh et al., 2009).

En outre, l'activité des complexes Cycline A / Cdk2 et cycline E / Cdk2 semble être augmentée dans ce contexte, conduisant à un environnement prolongé de phase pseudo-S dont les conditions sont favorables à la réplication de l'ADN viral (Kudoh et al., 2005).

EBV utilise l'activation ATM pour faciliter sa propre réplication. Mais l'activation d'ATM au long terme peut favoriser l'accumulation de p53 et favoriser l'apoptose de la cellule, ce qui serait délétère au virus. Au cours du cycle lytique, le niveau de p53 s'avère constant malgré l'activation récurrente de la voie de réparation de l'ADN et semble être régulé par une dégradation protéasomale (Kudoh et al., 2005). De plus, BZLF1 s'associe à p53, inhibe son activité transactivatrice et la conduit dans le compartiment de réplication de l'EBV (Kudoh et al., 2005), ce qui limite grandement la capacité de p53 à activer les gènes pro-apoptotiques. Même dans ce cas, BHRF1, un analogue viral de la protéine BCL-2 exprimé au début du cycle lytique, inhibe un large panel de protéines pro-apoptotiques telles que BIM, BID, BAK ou PUMA (Kvansakul et al., 2010).

ii. Lors de la latence

ATM est également impliquée dans les premières étapes de l'établissement de la latence EBV où elle joue un rôle de suppresseur de tumeur. *In vitro*, l'hyperprolifération précoce des lymphocytes B infectés est associé à l'activation ATM, entraînant la mort de la majorité des cellules (Nikitin et al., 2010). Au total, environ 3% des lymphocytes B infectés survivent et deviennent des lymphoblastes proliférant indéfiniment (Henderson et al., 1977). Il a été démontré que certaines protéines de latence de l'EBV interagissent avec ATM ainsi qu'avec d'autres protéines liées aux dommages de l'ADN, mais l'implication globale d'ATM dans le cycle latent reste à explorer.

LMP1 régule positivement BMI-1 dans les lymphomes de Hodgkin, une protéine apparentée au complexe Polycomb, et les deux protéines combinent leurs effets pour réguler négativement l'expression ATM (Dutton et al., 2007). De même, l'infection par EBV de la lignée BJAB a montré une inhibition de la réponse aux CDB (Gruhne et al., 2009).

De plus, des biopsies de patients atteints d'un carcinome nasopharyngé (NPC) associé à EBV ont révélé une régulation négative des taux de protéines ATM (Bose et al., 2009). D'autre part, il a été rapporté que LMP1 régule positivement ATM dans les NPC en activant la voie NF- κ B (Ma et al., 2011). Cette divergence dans l'effet de la LMP1 sur l'expression d'ATM n'est pas claire et peut être due à différents niveaux d'expression de LMP1 ou à l'utilisation de différents types de lignées cellulaires (figure 6).

EBNA1 régule la sous-unité catalytique de Nox2 dans le complexe NADPH oxydase, induisant la production de ROS qui pourraient activer ATM (Gruhne et al., 2009). Les cellules BJAB infectées par EBV exprimant EBNA1 présentent également plus d'aberrations chromosomiques (Gruhne et al., 2009). EBNA3C, une protéine virale essentielle à la transformation, s'est avérée atténuer les voies de réponse aux dommages de l'ADN au cours des premières étapes de la transformation. Elle inhibe également l'activité de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Figure 6), telles que P14, P16, P27, CHK2, p53 et BUBR1 (Maruo et al., 2011, Skalska et al., 2010, Knight et Robertson, 2004, Choudhuri et al., 2007, Saha et al., 2011, Gruhne et al., 2009a). EBNA3A semble collaborer avec EBNA3C dans l'inhibition de P14 et P16 (Maruo et al., 2011).

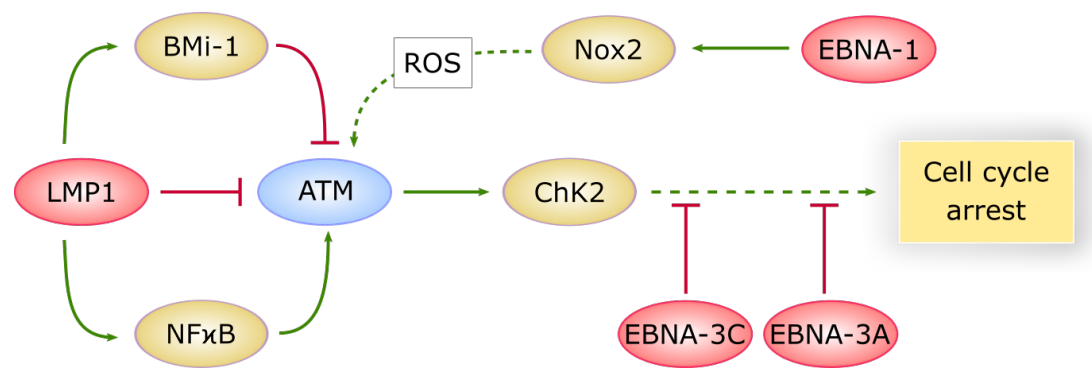


Figure 6 : ATM est régulée par EBV pendant la latence. Dans le cycle latent, LMP1 inhibe ATM et induit Bmi-1, qui inhibe également ATM. D'autre part, LMP1 active la voie NF κ B qui active ATM. EBNA-1 induit NOX2, ce qui génère des ROS pouvant activer ATM. Une fois activé, ATM active CHK2 qui favorise l'arrêt du cycle cellulaire. Cependant, EBNA-3C et EBNA-3A inhibent de nombreuses protéines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire. (D'après Dutton et al., 2007 ; Gruhne et al., 2009b ; Ma et al., 2011 ; Saha et al., 2011 ; Maruo et al., 2011)

Il existe également des preuves d'un rôle d'ATM dans la régulation du cycle latent du virus herpes associé au sarcome de Kaposi (KSHV pour *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus*) et du γ -herpèsvirus 68 murin (MHV68 pour *Murine gammaherpesvirus 68*), deux virus étroitement apparentés à EBV. Pendant la latence du KSHV, il existe une phosphorylation régulière d'une petite quantité d'ATM et de γ H2AX, qui joue un rôle dans la transactivation de LANA-1, la principale protéine de latence (Singh et al., 2014). Au cours de la latence du MHV68, ATM joue un rôle dans la transactivation de la protéine ORF73 qui est analogue à LANA-1. L'inactivation d'ATM réduit de manière significative l'expression de LANA-1 (Singh et al., 2014) et ORF73 (Kulinski et al., 2012) respectivement, démontrant l'importance d'ATM dans le contrôle de la latence de KSHV et MHV68.

7. Problématique

L'incidence accrue des tumeurs malignes chez les patients atteints d'AT a principalement été liée à l'instabilité génétique provoquée par des anomalies de réparation de l'ADN. Le taux élevé de tumeurs malignes associées à l'EBV peut être interprété comme la conséquence d'une immunodéficience associée à l'AT. La plupart des patients ne présentent cependant pas d'infections opportunistes, ce qui reflète l'absence de déficit immunitaire cellulaire profond. Bien que les données soient peu probantes, les patients atteints d'AT semblent présenter un déficit en iNKT, susceptible de contribuer au défaut de contrôle de l'EBV. La contribution du déficit en iNKT à la propension des patients atteints d'AT à développer une EBV-LPD nécessite des études complémentaires.

Outre l'immunodéficience, ATM peut également contribuer aux EBV-LPD associées à l'AT, en interférant avec la régulation intrinsèque de l'EBV dans les lymphocytes B. ATM est connue pour jouer un rôle pendant le cycle lytique de l'EBV. Elle participe à la création du compartiment de réplication du virus et à la promotion de sa réplication. Pendant la latence, plusieurs protéines virales semblent interférer avec l'expression d'ATM ou avec sa signalisation en aval. Cependant, son effet sur la régulation de la latence virale n'est pas encore connu.

Le fait qu'ATM joue un rôle dans la régulation des protéines de latence d'autres herpesvirus tels que KSHV ou MHV68, suggère qu'elle pourrait également être impliquée dans le contrôle de la latence de l'EBV.

L'implication d'ATM dans l'inhibition de l'expression des gènes suggère qu'elle pourrait aussi inhiber la transcription de gènes viraux, tels que le principal oncogène de l'EBV, LMP1. La déficience en ATM chez les patients atteints d'AT pourrait donc libérer cette inhibition, contribuant à la lymphomagenèse (Figure 7). ATM pourrait également participer à la restriction de la latence EBV en favorisant la transition de la latence de type III au type II et / ou de type II au type I. Le grand nombre de lymphomes de Hodgkin associés à l'EBV survenant chez les patients AT, dont les cellules tumorales dérivent de lymphocytes B infectés par EBV en latence de type II (Hansmann et al., 1995), suggère que la restriction de la latence peut s'avérer inefficace chez les patients AT.

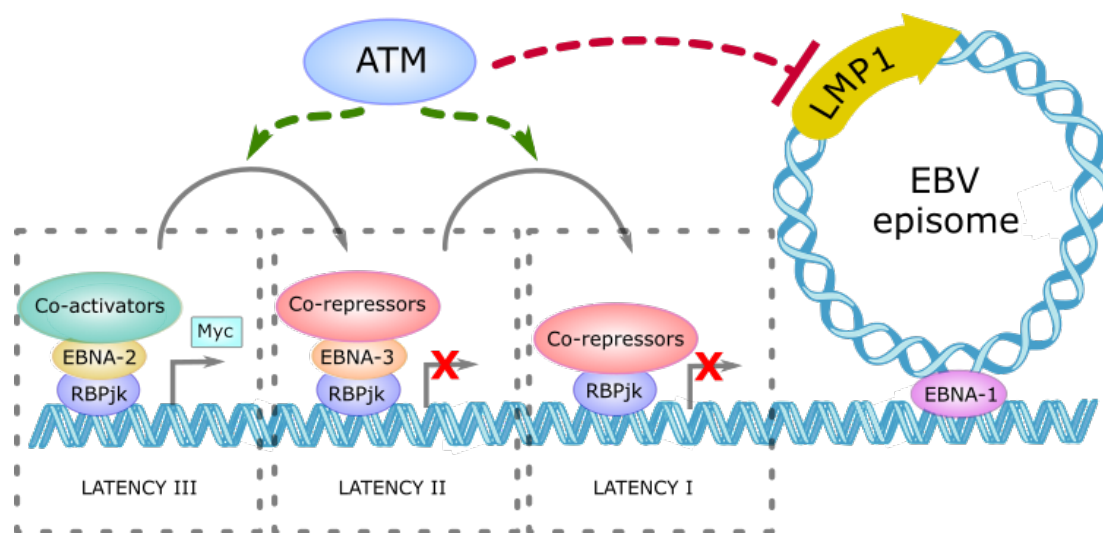


Figure 7 : Implication potentielle d'ATM dans la régulation de la latence EBV. ATM pourrait être impliquée dans l'inhibition de l'expression de certains oncogènes viraux, tel que le principal oncogène viral LMP1. ATM pourrait également favoriser la restriction progressive de la latence EBV, de la latence de type III au type I. Dans la latence de type III, EBNA-2 interagit avec la cible de la voie Notch RBP-jk, recrute des coactivateurs et induit la transcription de gènes pro-prolifératifs comme MYC. En latence de type II, EBNA-3 remplace EBNA-2 et recrute des corépresseurs, empêchant ainsi une expression prolongée de MYC. Dans la latence de type I, la RBP-jk est associée aux corépresseurs et seule EBNA-1 reste exprimée, ce qui permet la fixation de l'épisome de l'EBV sur le chromosome cellulaire.

8. METHODE EXPERIMENTALE

a. Choix du modèle expérimental

i. Choix des lignées lymphoblastoïdes

Le but de ce projet est d'étudier le rôle d'ATM dans le contrôle de la latence du virus d'Epstein-Barr, et ainsi de mieux comprendre la susceptibilité particulière des patients atteints d'ataxie-télangiectasie aux néoplasies induites par EBV. Pour étudier le contrôle de la latence de l'EBV dans un contexte de mutation d'ATM, nous devons choisir un modèle expérimental comprenant des cellules mutées ATM et infectées par EBV à l'état latent. Deux modèles sont alors possibles : partir de coupes de cancers EBV induits issus de donneurs sains et de patients atteints d'AT, ou partir de lignées lymphoblastoïdes infectées par EBV issues de donneurs sains et de patients atteints d'AT. L'étude de la latence de l'EBV sur les coupes histologiques de cancers de patients atteints d'AT induits par EBV est un projet clinique en cours, en collaboration avec le service d'anatomopathologie de l'hôpital Necker, dont je ne vais pas m'occuper.

Nous avons donc opté pour le choix de lignées lymphoblastoïdes issues de donneurs sains et de patients atteints d'AT. Ces lignées sont en latence de type III et expriment l'ensemble des 9 gènes de latence de l'EBV. Le taux d'expression des gènes de latence de l'EBV dans ces lignées est comparable aux taux qu'on retrouve *in vitro*, ([Thorley-Lawson et Allday, 2008](#)). Ces lignées sont pratiques à utiliser car leurs conditions de culture sont standardisées et peuvent être produites rapidement en grande quantité. Le principal défaut de ces lignées est leur grande variabilité d'expression des gènes viraux et cellulaires ([Mandage et al., 2017](#)). Ce défaut sera limité par l'analyse simultanée de 14 lignées.

ii. Etablissement des lignées

Pour générer les lignées lymphoblastoïdes, du sang issu de donneurs sains et de patients atteints d'AT a été prélevé puis centrifugé sur gradient de Ficoll. Les cellules mononucléées du sang périphérique (*PBMC pour peripheral blood mononuclear cells*) ont ensuite été isolées et infectées *in vitro* par EBV en présence de ciclosporine, une drogue permettant d'inhiber la réponse immunitaire induite par les lymphocytes T. L'infection par EBV transforme les lymphocytes B. Les lignées sont ensuite cultivées pendant un mois environ, le temps que la vitesse de prolifération s'homogénéise et que toutes les cellules non transformées soient éliminées.

Nous avons pu récupérer 7 lignées lymphoblastoïdes issues de patients atteints d'AT (LCL-AT) ainsi établies provenant du laboratoire du Généthon pour 5 d'entre elles et du centre de ressources biologiques de l'institut Imagine pour 2 d'entre elles. Nous avons également pu récupérer 7 lignées lymphoblastoïdes issues de donneurs sains (LCL-WT) provenant du centre de ressources biologiques de l'institut Imagine.

Malheureusement nous ne disposons que d'une partie du profil mutationnel des lignées LCL-AT (cf Matériels et Méthodes, Tableau 2). Une vérification du phénotype d'ATM dans les LCL-WT et les LCL-AT sera réalisée en début de cette thèse pour vérifier qu'ATM est fonctionnel dans les LCL-WT et ne l'est pas dans les LCL-AT. Cette vérification sera réalisée à l'aide d'un Western-Blot pour rechercher l'expression de la protéine ATM, ou en étudiant la phosphorylation de γ -H2AX après induction de cassures doubles brin. Cette protéine ne peut être phosphorylée que par ATM et est un témoin indirect de la fonction d'ATM.

b. Objectifs généraux

i. Etude de l'expression des gènes de latence

Notre première hypothèse est qu'ATM inhibe directement l'expression des gènes de latence de l'EBV. La levée de cette inhibition chez les patients atteints d'AT serait responsable d'un

taux plus élevé de protéines de latence oncogéniques qui augmenterait le risque de développer une pathologie maligne. Cette hypothèse s'appuie sur le fait qu'ATM intervient dans le cycle lytique de l'EBV et dans le contrôle de la latence du KSHV et du MHV68 comme vu précédemment (Singh et al., 2014 ; Kulinski et al., 2012), et qu'ATM peut également inhiber l'expression des gènes (Shanbhag et al., 2010).

Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier l'expression des gènes de latences de l'EBV dans les LCL-WT et LCL-AT, par RT-PCR quantitative en utilisant la méthode du Δ Ct et à l'aide de l'expression de la β 2 microglobuline comme contrôle interne. Une lignée humaine de lymphome du manteau EBV négative (JEKO) a été utilisée comme contrôle négatif.

Le panel de gènes, les sondes et le protocole utilisés ont déjà été validés dans la littérature pour l'analyse de l'expression des gènes de l'EBV (Iwata et al, 2010). Les principales caractéristiques des gènes étudiés ici sont les suivants :

- LMP-1 : principal oncogène de l'EBV
- LMP-2 : analogue de la voie Notch activée, partie commune à LMP-2A et -2B
- EBNA-1 : maintien de l'épisome viral sur les chromosomes cellulaires
- EBNA-2 : principal transactivateur de l'EBV
- BZLF1 : première protéine activée lors du switch vers le cycle lytique
- B2M : contrôle interne

ii. Etude de la restriction de la latence

Notre seconde hypothèse est qu'ATM intervient dans la restriction progressive de la latence, en favorisant le passage d'une latence de type III où de nombreuses protéines de latences oncogéniques sont exprimées à une latence de type II puis I où de moins en moins de protéines de latences sont exprimées. L'absence d'ATM chez les patients atteints d'AT favoriserait une latence plus élevée exprimant plus de protéines de latences oncogéniques et favorisant ainsi le développement de pathologie malignes. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que la majorité des cancers développés par les patients atteints d'AT sont des lymphomes diffus à grande

cellules B (*DLBCL pour Diffuse Large B-Cell Lymphoma*) et des lymphomes de Hodgkin qui sont pour la plupart positifs pour EBV (Suarez et al., 2015). Or ces lymphomes sont décrits comme étant en latence de type II et comme étant dérivés de centres germinatifs. Un défaut de restriction de la latence de l'EBV chez les patients AT pourrait apporter une explication à cette observation. La latence de l'EBV dans ces cancers n'a toutefois pas été évaluée chez les patients atteints d'AT, il se pourrait qu'elle soit différente de celle des cancers de la population générale.

In vivo, la restriction de cette latence à lieu dans le centre germinatif, les lymphocytes B infectés par EBV entrant en latence de type III et sortant en latence de type I. L'environnement du centre germinatif pourrait avoir un impact différent sur la restriction de la latence des cellules infectées par EBV chez les patients atteints d'AT par rapport aux personnes saines. Dans l'environnement du centre germinatif, nous nous sommes intéressés à l'activation du BCR et à la stimulation par l'interleukine 21 (IL21) car ces deux phénomènes ont été décrit comme ayant un impact sur l'expression des gènes de latences de l'EBV. En condition physiologique l'activation du BCR permet de tester son affinité pour l'antigène suite à l'hypermutation somatique. Dans les LCL-WT, l'activation du BCR est bloquée par la protéine de latence LMP-2A (Dykstra et al., 2001). La stimulation par l'IL21 quant à elle permet la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes ou en lymphocyte B mémoire (Zotos et al., 2010). Dans les LCL-WT, la stimulation par l'IL21 augmente l'expression de la protéine de latence LMP-1 et impose aux cellules une latence de type II.

L'effet de l'activation du BCR ou de la stimulation par l'IL21 pourrait avoir un effet différent sur l'expression des gènes de latence de l'EBV dans les LCL-AT. Pour tester cette hypothèse, nous allons étudier par RT-PCR quantitative, l'expression du set de gènes de latence préalablement définis dans les LCL-WT et LCL-AT, avant et après activation du BCR ou stimulation par IL21.

II. MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

1. Etablissement des lignées lymphoblastoïdes

Les lignées lymphoblastoïdes ont été établies au laboratoire du Généthon et au centre de ressources biologiques de l'institut Imagine. Du sang de patients atteints d'AT d'une part, et du sang de donneurs sains d'autre part, a été prélevé sous héparine après consentement libre et éclairé, selon les recommandations éthiques. Les cellules mononuclées du sang ont été extraites par la méthode Ficoll-Hypaque en récupérant la couche de cellules mononuclées après centrifugation en gradient de densité. Les cellules ont ensuite été resuspendues à 1 million de cellules par mL dans du RPMI enrichi (*cf* Culture cellulaire) puis mises en présence de la souche B95-8 de l'EBV à une multiplicité d'infection de 50 à 100, avec 500 µg/mL de ciclosporine A pour inhiber les lymphocytes T. La culture est laissée 2 semaines puis passée progressivement selon la confluence. Après 1 mois de culture, les lignées sont jugées stables pour une utilisation en laboratoire. Certaines d'entre elles sont ensuite phénotypées pour leur mutation d'ATM (tableau 2). Ainsi, 7 LCL issues de patients atteints d'AT (LCL AT : A1 à A7) et 7 LCL issues de donneurs sains (LCL WT : L1 à L7) ont été établies.

	Allele 1 mutation	Allele 2 mutation	Exon/Intron (GRCh38)	Protein
A1	Not identified	Not identified	Not identified	Not identified
A2	Not identified	Not identified	Not identified	Not identified
A3	c.5644C>T	c.5644C>T	exon 37	p.Arg1882*
A4	c.9022C>T	c.9022C>T	exon 63	p.Arg3008Cys
A5	c.5496+2_c.5496+5del	c.5496+2_c.5496+5del	exon 46	frameshift
A6	Not identified	Not identified	Not identified	Not identified
A7	c.6679C>T	c.6679C>T	Exon 46	p.Arg2227Cys

Tableau 2 : Mutations du gène ATM dans les LCL AT. Parmi les lignées cellulaires établies issues de patients atteints d'AT, certaines ont été phénotypées pour leur mutation du gène ATM. Pour ces dernières, la position intronique ou exonique ainsi que l'effet de la mutation sur la protéine ont été déterminés *in silico*.

2. Culture cellulaire

Les LCL ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO₂, cultivées dans un milieu *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI 1640, Gibco) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Gibco), 2 mM de L-glutamine (Invitrogen) et 1% de solution de pénicilline-streptomycine (Sigma). Les LCL ont été passées tous les 3 jours en remplaçant la moitié du milieu de culture avec du milieu frais.

3. Traitements

Pour les besoins de différentes expériences, les LCL ont été irradiées ou traitées avec de la doxorubicine, de l'interleukine 21 ou un anticorps agoniste du BCR. Les cellules ont été traitées en phase exponentielle de croissance à une concentration d'environ 500 000 cellules par mL.

Pour les tests d'irradiations, les flasques de cultures ont été exposés à 0 Gy (flasques contrôles, posés à température ambiante à côté de l'irradiateur), ou 5 Gy avec un débit de dose de 1Gy / min, généré à partir d'un tube à rayon X haute tension (jusqu'à 320 kV). Les flasques sont ensuite remises en culture sur 24h avant extraction de l'ARN ou des protéines. La solution mère de doxorubicine (1mM) nous a gracieusement été fournie par la pharmacie de l'Hôpital Necker (Paris). Les cellules ont été traitées par 4 µM de doxorubicine pendant 72h. L'interleukine 21 (rh IL-21, ImmunoTools GmbH) a été diluée dans de l'eau milliQ stérile (50 µg/mL) selon les recommandations du fabricant. Les cellules ont été traitées par 10 ng/mL d'IL21 pendant 24h. La solution mère d'anticorps agonistes du BCR (AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgM, Jackson ImmunoResearch) a été diluée dans du PBS (1,2 mg/mL). Les cellules ont été traitées par 10 µg/mL d'anticorps pendant 24h. Les solutions mères ont été dilués dans du milieu de culture avant traitement des cellules.

2. TECHNIQUES UTILISEES

1. Prolifération

La prolifération des LCL a été mesurée en utilisant un IncuCyte (Essen Bioscience). Cet appareil consiste en un microscope automatisé à contraste de phase et à fluorescence pouvant prendre des photos, placé dans un incubateur à 5% de CO₂ et à 37°C et pouvant contenir des plaques de cultures.

Les LCL issues de donneurs sains et de patients atteints d'AT ont été comptées en phase exponentielle de croissance sur lame KOVA (fisher scientific), puis placées dans des plaques 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits. Les plaques ont été mises en culture dans l'IncuCyte, puis des images ont été acquises toutes les 12h. Les courbes de prolifération ont été construites à partir des mesures de confluence acquises au cours de l'imagerie sur une durée de 144 heures, en utilisant le logiciel IncuCyte ZOOM™ (Essen BioScience).

2. SeaHorse

Le taux de consommation d'oxygène (OCR pour *Oxygen Consumption Rate*) et le taux d'acidification extracellulaire (ECAR pour *Extracellular Acidification Rate*) ont été mesurés en milieu XF (milieu Dulbecco/Vogt Modified Eagle's minimal essential Medium (DMEM) non tamponné contenant 2 mM de glutamine, pH 7,4) en condition basale et en réponse à différentes drogues : oligomycine (1 µM), carbonylcyanide-4-(trifluorométhoxy) phenylhydrazone (FCCP, 1 µM) et antimycine A (1 µM) pour l'OCR ; glucose (10 mM), oligomycine (1 µM) et 2-désoxyglucose (2-DG, 50 mM) pour l'ECAR, en utilisant un analyseur de flux extracellulaire XFe96 (Agilent). Les LCL issues de donneurs sains et de patients atteints d'AT ont été isolées en phase exponentielle de croissance, puis lavées. Elles ont été placées dans des plaques Seahorse revêtues de CellTak (Corning) en triplicats par condition avec 300 000 cellules par puits. La plaque a ensuite été centrifugée à faible vitesse pour faire adhérer les cellules, puis l'OCR et l'ECAR ont été analysés en temps réel pendant 84 minutes. Les mesures ont été réalisées grâce au Dr Ivan Nemazany, professeur agrégé (Faculté de Médecine, Université Paris Descartes).

3. Cycle cellulaire

Environ 500 000 cellules ont été récoltées puis lavées deux fois avec du PBS pour les débarrasser du milieu de culture. Elles sont alors incubées 15 min à 37°C dans une solution composée de 1mg/L de citrate de sodium, 1mL/L de Triton X100, et 50mg/L d'Iodure de Propidium dilué dans une solution saline tamponnée au phosphate (PBS pour *Phosphate buffer saline*). La réaction est ensuite stoppée avec l'adjonction de PBS à 4°C. Le cycle cellulaire est ensuite analysé sur un BD FACSCanto II en utilisant les logiciels DIVA et FlowJo (Tree Star, USA).

4. Immunofluorescence

Environ 200 000 cellules par conditions ont été récoltées, déposées dans des puits de Labteck (Dutscher) préalablement induits de Poly-L-Lysine (Sigma-Aldrich) selon les recommandations du fabricant, puis mises en culture sur 24h. Les cellules sont ensuite lavées au PBS, fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées avec du Triton X100 0,1%. Les cellules sont ensuite de nouveau lavées, saturées avec un agent de blocage (Antibody diluent, Dako) puis incubées avec un anticorps anti- γ -H2AX (Phospho S39, Abcam) durant la nuit à 4°C. Les cellules sont ensuite lavées et incubées avec un anticorps secondaire (Donkey anti-rabbit AF488, Life Technologies). Les lames sont montées sur lamelles et les noyaux des cellules sont marqués avec du 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI, FLuoroshield, Sigma), puis observés sous un microscope Leica TCS SP8 STED.

5. RT-PCR quantitative

Environ 5 millions de cellules ont été récoltées en phase exponentielle de croissance, puis lavées deux fois avec du PBS. L'ARN a ensuite été extrait en utilisant le RNeasy Mini Kit Plus (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. La concentration de l'ARN a été déterminée par spectrophotométrie (NanoDrop 2000, Thermo). La rétrotranscription a été réalisée à partir de ces ARN en utilisant un SuperMix contenant tous les réactifs nécessaires (iScript Reverse Transcription Supermix, BioRad), selon les recommandations du fabricant.

Les ADN complémentaires sont ensuite de nouveau dosés par spectrophotométrie puis stockés à -80°C.

La transcription inverse-amplification en chaîne par polymérase (RT-PCR pour *Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*) quantitative a été réalisée par la méthode TaqMan, en utilisant les primers et les sondes décrits dans le Tableau 3. Le mélange réactionnel est composé de 50% de MasterMix (SensiFAS Probe Hi-ROX, Biorline), 200 nM de primers forward et reverse, 100 nM de sondes, et 100 ng d'ADN complémentaire, le tout dilué dans 30 µL d'eau RNase free. La réaction de PCR est réalisée selon les réglages suivants : 2 min à 95°C, 35 cycles composés de 15 sec à 95°C et 1 min à 60°C, puis conservation à 4°C (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, BioRad). Les résultats ont été analysés avec Microsoft Excel selon la méthode du $\Delta\Delta C_T$.

Gene cible	Sequence (5'-3')	Position*
LMP1		
Forward Primer	CCCTTTGTATACTCTACTGATGATCAC	168745-168772
Reverse Primer	ACCCGAAGATGAACAGCACAAT	168593-168614
Probe	FAM - CTCATCGCTCTCTGGAATTTGCACGG - TAMRA	168659-168634
LMP2		
Forward Primer	AAGATCCTTCTGGCAGACTGT	1070-1091
Reverse Primer	TGCAGAACAAATTGGGTATAAATTCA	1183-1208
Probe	FAM - TCTCGCACTCTTGTTGCTAGCCTCCG - TAMRA	1102-1127
EBNA1		
Forward Primer	GGAGCCTGACCTGTGATCGT	55281-55300
Reverse Primer	TAGGCCATTTCAGTCTGTGA	95703-95682
Probe	FAM - CGCGGCCGTCTCCTTTAAGTGTGA - TAMRA	55343-55361/95654-95658
EBNA2		
Forward Primer	TTAGAGAGTGGCTGCTACGCATT	35594-35616
Reverse Primer	AGTGCTGGGTTACTGGCTAAGC	36111-36098/35711-35704
Probe	FAM - CAGTAACCACCCAGCGCCAATCTGTCT - TAMRA	35639-35665
BZLF1		
Forward Primer	ACGCACACGGAACCACAA	90397-90379
Reverse Primer	CTTAAACTTGGCCCGGCATT	90162-90181
Probe	FAM - AATCGCATTCTCCAGCGATTCTGG - TAMRA	90227-90242/90367-90375
B2M		
Forward Primer	GAGTATGCCTGCCGTGTG	4158-4175
Reverse Primer	AATCCAAATGCGGCATCT	6144-6127
Probe	FAM - CCTCCATGATGCTGCTTACATGTCTC - TAMRA	6121/4870-4846

Tableau 3 : Liste des primers et des sondes de RT-PCR quantitative. Les primers sens (Forward primer), anti-sens (Reverse primer) et Sondes (Probe) ci-dessus ont été utilisés pour déterminer l'expression des gènes de latence virale LMP-1, LMP-2, EBNA-1, EBNA-2, du gène de cycle lytique précoce BZLF1 dans différentes conditions, en utilisant l'expression de B2M comme contrôle interne.

6. Western Blot

Environ 5 millions de cellules ont été récoltées en phase exponentielles de croissance puis lavées dans du PBS froid. Les protéines totales ont été extraites en utilisant 30 μ L de tampon de lyse *Radioimmunoprecipitation assay buffer* (RIPA) puis solubilisées en utilisant 30 μ L de tampon Laemmli chauffé à 100°C. Les concentrations en protéines des extraits ont été déterminées en utilisant le test BCA (Thermo/Pierce). 40 μ g d'extrait protéiques ont été déposés sur gel SDS-PAGE 12% (*Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, Bio-Rad) puis séparés par électrophorèse et transférés sur membrane de Polyfluorure de vinylidène (PVDF pour *Polyvinylidene Fluoride*, Millipore). Après une incubation de 2 heures dans une solution de blocage (5% de lait en poudre dans une solution saline tamponnée au Tris avec 0,1% de Tween (TBST pour *Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween*)), les membranes ont été incubées avec les anticorps primaires appropriés pendant une nuit à 4°C : anti-ATM (Cell Signaling), anti-LMP-1 (CS 1-4, Dako), anti-LMP-2 (Santa-Cruz), β -actine (A5316, Sigma). Après lavage dans du TBST, les membranes ont été incubées avec les anticorps secondaires de souris ou de lapin appropriés couplés à la peroxydase de raifort (HRP pour *horseradish peroxidase*, Dako). Les protéines ont été visualisées en utilisant la technique de chimiluminescence améliorée (ECL pour *Enhanced Chemiluminescence Substrate*, Amersham, Little Chalfont, Buckinghamshire, Royaume-Uni) dans un système d'Imagerie Chemidoc (BioRad).

7. Séquençage d'ARN

1. Extraction de l'ARN

Environ 10 millions de cellules ont été récoltées en phase exponentielle de croissance puis lavées deux fois avec du PBS. L'ARN a ensuite été extrait en utilisant le kit Rneasy Mini Kit Plus de chez QIAGEN. Ce Kit contient une colonne additionnelle par rapport au Rneasy Mini Kit qui permet d'éliminer d'éventuelles séquences d'ADN contaminantes.

La concentration de l'ARN total extrait a été mesurée par spectrométrie en utilisant un Xpose (Trinean). L'intégrité de l'ARN a été analysée par électrophorèse capillaire à l'aide d'une Tape Station (Agilent). Seuls les échantillons avec un score d'intégrité de l'ARN (RIN pour *RNA integrity number*) supérieur à 9 ont été conservés pour un traitement ultérieur.

2. Construction de la bibliothèque

Le système Ovation Universal RNA-Seq de NUGEN a été utilisé pour construire les bibliothèques de RNA seq spécifiques de brins à partir de 100 ng d'ARN total. Ce système utilise la technologie InDA-C (Insert Dependent Adapter Clivage) permettant une déplétion ciblée des transcrits ribosomiaux en utilisant des amorces ribosomiques humaines InDA-C personnalisées ajoutées pendant l'étape de rétrotranscription. La déplétion de l'ARN ribosomal (ARNr), contrairement à la sélection par PolyA, permet de conserver des ARN non polyadénylés tels que certains ARN de l'EBV et des microARN cellulaires. Ce système fournit 16 adaptateurs uniques pour permettre un séquençage multiplex.

Brièvement, les ARN totaux ont été rétrotranscrits en ADNc simple-brin ; le second brin est ensuite synthétisé en utilisant des analogues nucléotidiques. Les ADNc alors double-brin ont été fragmentés mécaniquement en utilisant un Covaris S220. Les extrémités ont été réparées puis liguées avec des adaptateurs marqués par un analogue nucléotidique compatible avec le séquenceur Illumina. L'utilisation d'analogues nucléotidiques permet de faire une sélection de brins pour distinguer le brin sens du brin antisens. Un clivage des adaptateurs induit par InDA-C est ensuite effectué pour permettre la déplétion des transcrits ribosomiaux, qui représentent la grande majorité des transcrits. Enfin une PCR finale a permis d'amplifier la bibliothèque de RNA seq ainsi créée.

3. Séquençage

Le séquençage de l'ARN a été effectué sur un Illumina HiSeq 2500, en multiplexant 12 banques (échantillons) par ligne pour obtenir une profondeur de séquençage de 70 millions de reads en paire-end par bibliothèque, avec une longueur de reads d'environ 130 nucléotides. Les séquençages d'ARN ont été réalisés par la plateforme de génomique de l'Institut Imagine.

4. Analyse bioinformatique

Les fichiers Fastq sortant de la machine de séquençage ont été transférés à la plateforme de bioinformatique de l'institut Imagine. La qualité des séquences a été déterminée par le package FastQC sur le logiciel R. Les séquences ont été trimées, puis alignées sur le génome humain (hg19) et sur celui de l'EBV (B95-8, accession number V01555.2) en utilisant le package Hisat2. Les comptes bruts ont été déterminés par le package FeatureCounts. L'analyse différentielle a été réalisée en utilisant les packages DESeq2, Edger et LimmaVoom. L'analyse fonctionnelle a ensuite été réalisée en utilisant le package Ensemble of Gene Set Enrichment Analyses (EGSEA) sur R.

8. Construction des vecteurs Crispr/CAS9

Les séquences cibles du système Crispr/CAS9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - Crispr associated protein 9*) ont été conçues *in silico* (crispr.mit.edu/), synthétisées (Integrated DNA Technologies, USA), puis intégrées dans les vecteurs PX459.V2 ou lentiCRISPR v2 (Addgene, USA) selon le protocole du fournisseur. La bonne intégration des séquences cibles a été vérifiée par séquençage Sanger (Eurofins Genomics, France). Les différents essais de transfection et transduction sont décrites dans la partie 5 du Chapitre I.

9. Phosphokinome

L'analyse du phosphokinome a été réalisée en utilisant un phosphokinase array (R&D systems, #ARY003B) permettant de détecter de manière concomitante la phosphorylation de 43 kinases, selon le protocole du fournisseur.

10. Statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel PRISM (GraphPad Software, INC, San Diego, Californie, USA). L'importance des différences entre les populations de données a été analysée en utilisant le test de Mann-Witney (non-paramétrique) avec un niveau de signification de $p \leq 0,05$.

III. RESULTATS

CHAPITRE 1 :
CARACTERISATION
DES LIGNEES

1. Défaut fonctionnel d'ATM

Pour s'assurer du phénotype des lignées LCL-WT et LCL-AT en notre possession, l'expression de la protéine ATM a été testée par Western-Blot (Figure 8A-B). Au sein des LCL-WT, toutes les lignées expriment la protéine ATM avec une légère diminution d'expression pour la lignée L2 par rapport aux autres. Au sein des LCL-AT, on observe une absence d'expression de la protéine ATM, hormis pour les lignées A4 et A6 où ATM est exprimée.

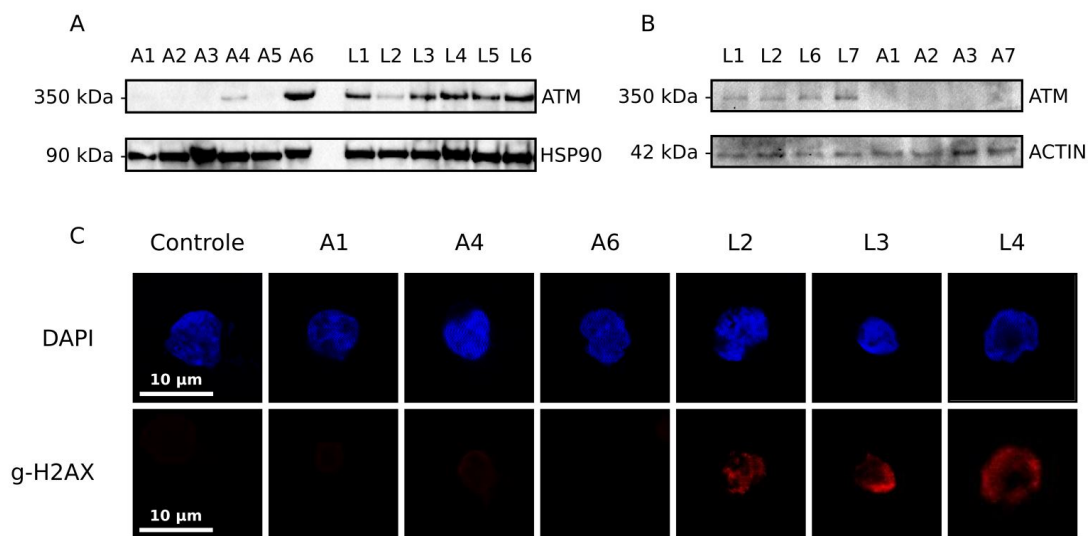


Figure 8 : Expression d'ATM et exploration de sa fonction. (A-B) L'expression d'ATM a été évaluée par Western Blot, en utilisant HSP90 (A) ou l'actine (B) comme témoin de charge. En raison du nombre d'échantillons, l'analyse n'a pas pu être réalisée sur un seul blot. (C) Immunofluorescence de la protéine γ H2AX après irradiation des lignées par 5Gy (bas), les noyaux des différentes cellules sont visualisés par le marquage DAPI (haut). Le contrôle correspond à l'utilisation de l'anticorps secondaire seul sur une lignée LCL-WT irradiée.

Les mutations d'ATM au cours de l'AT sont dans la majorité des cas des mutations non-sens conduisant à une absence totale d'expression de la protéine ATM. Cependant des mutations conduisant à une protéine exprimée mais non fonctionnelle ont aussi été décrites. Les lignées A4 et A6 ont donc été soumises à un test fonctionnel pour vérifier l'activité ou non d'ATM. Lors d'une CDB, ATM phosphoryle H2AX en position gamma permettant de recruter d'autres protéines de réparation. La phosphorylation de la protéine γ H2AX signe la présence d'une protéine ATM fonctionnelle car aucune autre kinase n'est apte à la phosphoryler.

Les lignées ont été irradiées par 5Gy pour induire des CDB puis les foyers γ H2AX ont été visualisés par immunofluorescence (Figure 8C). Les résultats montrent que les lignées A4 et A6 n'induisent pas la phosphorylation de γ H2AX et ont donc un défaut fonctionnel de la protéine ATM.

Les LCL-AT présentent tous un défaut fonctionnel d'ATM, avec pour la majorité d'entre elles une absence totale de la protéine ATM, alors que les LCL-WT présentent tous une protéine ATM fonctionnelle. Tout au long de ce manuscrit, ces deux groupes seront comparés par différentes techniques et dans différentes conditions.

2. Avantage prolifératif des LCL-AT

Les patients atteints d'AT développent plus de cancers induits par EBV que la population générale. Cette caractéristique suggère que l'EBV augmente le risque de transformation des cellules infectées des patients atteints d'AT. Selon la théorie actuelle de la progression tumorale, une cellule saine accumule une multitude de lésions, ou « hits » au cours du temps, qui peuvent conduire progressivement à sa transformation maligne. Ces hits consistent en des modifications génétiques, épigénétiques ou de l'environnement cellulaire procurant à la cellule des capacités de proliférations accrues, de résistance aux gènes suppresseurs de tumeurs, ou de résistance vis-à-vis de l'immunité antitumorale. La mutation d'ATM pourrait consister en un premier hit puis l'infection par EBV en un second hit rapprochant les cellules affectées de la transformation.

L'étude de la vitesse de prolifération est un bon moyen d'évaluer l'activation des gènes du cycle cellulaire, qui pourrait être différente entre les lignées LCL-WT et LCL-AT. Ces lignées ont été diluées à 200 000 cellules par mL puis ont été comptées trois jours plus tard sur lames KOVA (Figure 9A). Un Incucyte a également été utilisé pour mesurer l'expansion des cellules dans une plaque 96 puits, selon un protocole adapté aux cellules en suspension développé par le constructeur, en prenant régulièrement des photos de chaque puit (Figure 9B-D). Ces deux techniques montrent que les LCL-AT prolifèrent significativement plus rapidement que les LCL-WT, malgré une grande disparité de vitesse de prolifération au sein de chaque groupe.

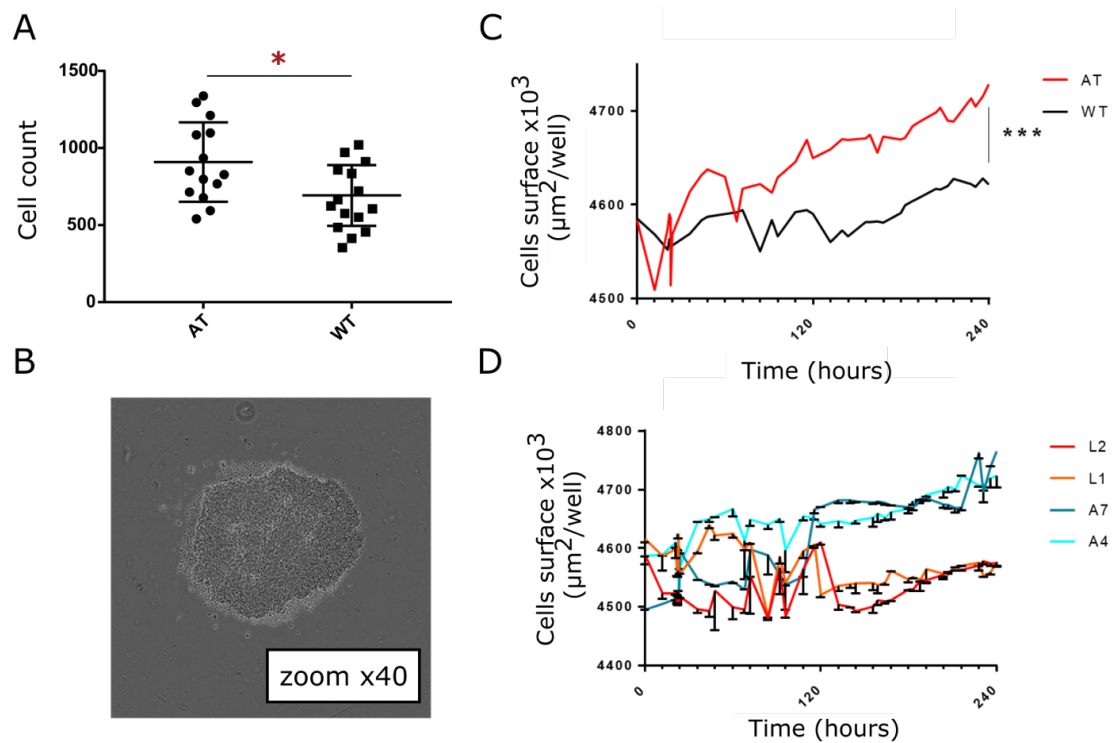


Figure 9 : Exploration de la vitesse de prolifération des lignées LCL-AT. (A) Les lignées LCL-WT et LCL-AT ont été diluées à 200 000 cellules, incubées puis comptées 3 jours plus tard sur lame KOVA (n=2). * : $p < 0,05$ (test non-paramétrique de Mann-Witney). (B-D) La prolifération des cellules est ensuite explorée en utilisant un Incucyte (n=8). (B) Zoom sur un puits analysé par l'Incucyte. (C) Le logiciel mesure l'augmentation de surface que prennent les cellules au cours du temps. Pour un souci de visualisation, seule la moyenne de la surface des lignées LCL-WT et LCL-AT est représentée. *** : $p < 0,001$ (test non-paramétrique de Mann-Witney). (D) Visualisation des 2 lignées les plus prolifératives et les moins prolifératives parmi les LCL-WT et les LCL-AT et représentation de l'écart-type pour chaque mesure de surface.

Cette vitesse de prolifération accrue des LCL-AT pourrait provenir d'une activation d'oncogènes plus importante au sein de ces lignées. Les LCL sont en phase de latence de type III et expriment l'ensemble des neuf gènes de latence de l'EBV dont la plupart sont décrits comme étant oncogènes. Une différence d'expression de ces gènes de latence entre les LCL-WT et les LCL-AT pourrait expliquer la différence de vitesse de prolifération observée.

3. Expression basale des gènes de latence virale

Les LCL sont en latence de type III et expriment neuf gènes de latence virale qui sont LMP-1, LMP-2A, LMP-2B, EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-LP, EBNA-3B et EBNA-3C. L'étude de l'expression des gènes de latence virale au sein des lignées LCL-WT et LCL-AT a été réalisée par RT-PCR quantitative. Le panel de gènes de latence étudié comprend LMP-1, LMP-2, EBNA-1 et EBNA-2 et a préalablement été validé dans la littérature pour l'analyse de l'expression des gènes de l'EBV (Iwata et al, 2010). L'induction du cycle lytique a aussi été évaluée dans les cellules par la mesure du transcrite précoce de cycle lytique BZLF1.

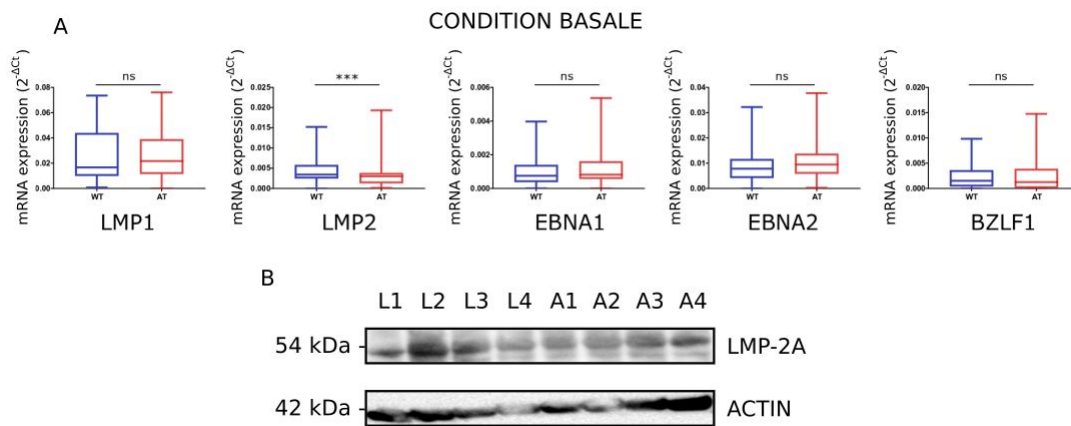


Figure 10 : Analyse de l'expression du panel de gènes viraux et de la protéine LMP-2A. (A) L'expression du panel de gènes viraux étudiés composés de LMP-1, LMP-2, EBNA-1, EBNA-2 et BZLF1 a été évalué par RT-PCR quantitative avec la méthode du calcul du 2^{-ΔCt} (en ordonnée) pour les lignées LCL-WT et LCL-AT en utilisant B2M comme contrôle interne. * : p < 0,05, *** : p < 0,001 (test non-paramétrique de Mann-Witney). (B) L'expression de la protéine LMP-2A a été évaluée par Western-Blot en utilisant l'expression de l'actine comme témoin de charge.

Les résultats montrent que LMP-2 est significativement moins exprimé dans les LCL-AT que dans les LCL-WT (Figure 10). Aucune différence n'est retrouvée pour les autres gènes viraux étudiés.

La différence pour LMP-2 étant observée de manière constante, un Western Blot a été réalisé. Les résultats du Western-Blot ne montrent toutefois pas de différence au niveau protéique pour LMP-2A. Cette différence pourrait éventuellement impliquer LMP-2B, mais ce dernier étant généralement beaucoup moins exprimé que LMP-2A, cette hypothèse reste peu probable.

4. Expression des gènes de latence après activation d'ATM

En condition basale, il n'y a pas de différence pour l'expression des gènes viraux étudiés, hormis une diminution de LMP-2 dans les LCL-AT par rapport aux LCL-WT. Le défaut d'ATM pourrait ne pas avoir d'effet sur la latence de l'EBV en condition basale ; en revanche, il pourrait se faire ressentir dans des conditions où ATM est normalement activée.

ATM activée pourrait modifier l'expression des gènes viraux dans les lignées LCL-WT et son défaut de fonction empêcherait ces modifications dans les lignées LCL-AT.

Pour tester cette hypothèse, les lignées LCL-WT et LCL-AT ont été irradiées par 5Gy pour induire des CDB, condition où ATM est activée. Vingt-quatre heures plus tard, l'ARN d'une partie des cellules a été extrait en vue d'une étude de l'expression des gènes viraux par RT-PCR quantitative et une autre partie a été extraite en vue d'une étude du cycle cellulaire. Sachant que les LCL-AT n'ont pas de protéines ATM fonctionnelles, ils ne peuvent ni réparer correctement les CDB, ni activer les points de contrôle du cycle cellulaire qui sont ATM-dépendantes. Seul ATR peut alors bloquer le cycle cellulaire en phase G2/M. Sur l'analyse du cycle cellulaire, on observe un pic en phase G2/M dans les LCL-AT après irradiation, qui est absent dans les LCL-AT non irradiées et absent dans les LCL-WT irradiées et non irradiées. Le blocage des LCL-AT en phase G2/M après irradiation confirme qu'il y a bien eu induction de CDB (Figure 11A).

L'étude du panel de gènes viraux après irradiation montre de nouveau une baisse d'expression de LMP-2 dans les LCL-AT (Figure 11B). Il n'y a pas de différence significative pour les autres gènes étudiés.

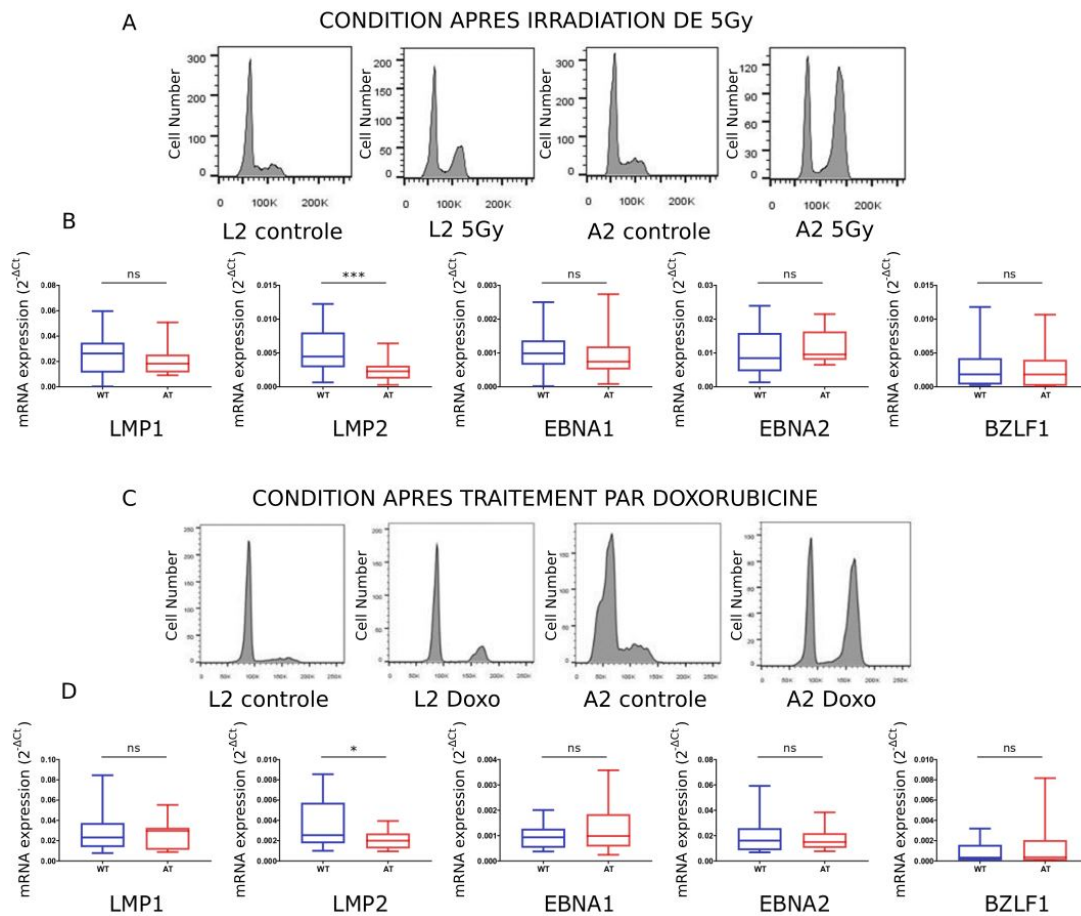


Figure 11 : Analyse de l'expression du panel de gènes viraux après induction de CDB. (A-C) analyse du cycle cellulaire comme contrôle de l'induction de CDB pour une lignée représentative LCL-WT et LCL-AT. (B-D) Expression du panel de gènes viraux par le calcul du $2^{-\Delta Ct}$ (en ordonnée) après induction de CDB. (A-B) induction de CDB par irradiation avec une dose de 5Gy ou (C-D) par incubation avec 4 μ M de Doxorubicine sur 72h. * : $p < 0,05$, *** : $p < 0,001$ (test non-paramétrique de Mann-Whitney).

L'irradiation est connue pour induire des CDB aussi pour induire des ROS qui pourraient modifier l'expression des gènes de latence. Pour confirmer nos résultats dans un contexte où les ROS ne sont pas induits, les LCL-WT et les LCL-AT ont été incubées avec de la doxorubicine, une anthracycline connue pour induire des CDB par blocage des fourches de réplication. Une étude du cycle cellulaire a de nouveau été réalisée et montre également un blocage du cycle cellulaire en G2/M dans les lignées LCL-AT incubées avec la doxorubicine (Figure 11C). Les résultats d'expression des gènes viraux étudiés sont identiques à ceux en condition post irradiation (Figure 11D), confirmant que les CDB ne modifient pas l'expression des gènes viraux étudiés, hormis une diminution de LMP-2 dans les LCL-AT.

5. CRISPR/Cas9

Comme vu précédemment, les lignées LCL possèdent une grande variabilité intragroupe. L'idéal pour pouvoir attribuer une modification du phénotype observé à la mutation d'ATM et non au hasard est d'obtenir deux lignées LCL isogéniques qui ne diffèrent que par la fonction d'ATM. Cela est possible par la méthode CRISPR-Cas9 en mutant ATM dans une lignée LCL-WT.

Deux inserts ont été conçus pour cibler le domaine FAT ou le domaine Kinase de la protéine ATM. Pour être le plus proche des conditions pathologiques, ces inserts ciblent des segments de la protéine ATM dont la mutation est connue pour donner le phénotype AT. Ces inserts ont été intégrés dans un vecteur PX459.V2 (Figure 12) puis testés après amplification dans des lignées 293T par transfection. Une sélection par puromycine a été réalisée pour ne garder que les cellules ayant exprimé le vecteur. L'avantage de la transfection par rapport à la transduction est l'absence d'intégration du matériel génétique dans l'ADN de la cellule hôte, qui pourrait selon son emplacement modifier l'expression des gènes.

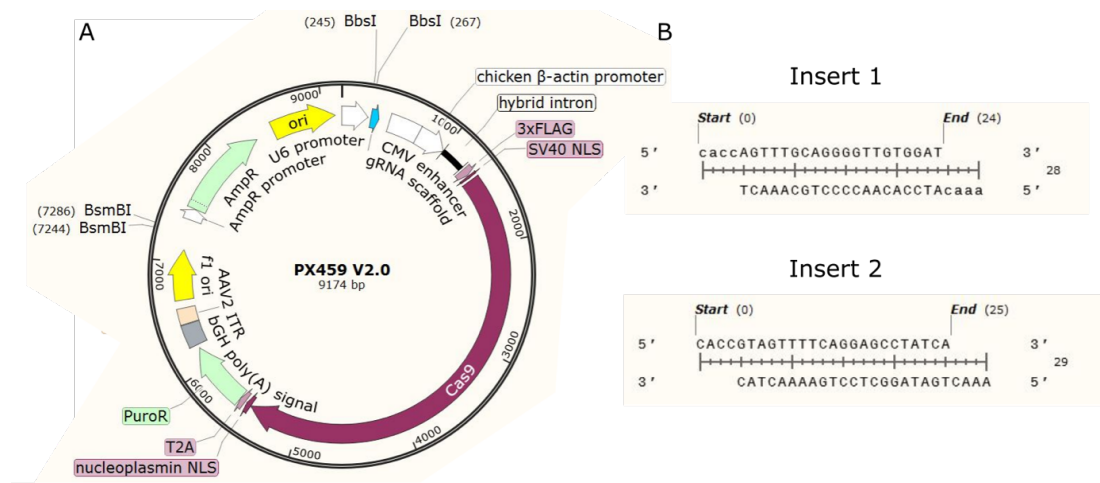


Figure 12 : Vecteur et guides utilisés pour la transfection par Crispr/Cas9. (A) Schéma du vecteur PX459.V2 utilisé. (B) Schéma de l'insert 1 ciblant le domaine FAT et de l'insert 2 ciblant le domaine Kinase d'ATM, préalablement conçu *in silico*.

Un séquençage Sanger a été réalisé sur les deux lignées 293T transfectés par les deux vecteurs et sur la lignée 293T saine, en utilisant des amorces de part et d'autre de la région mutée. Les chromatogrammes des résultats du séquençage ne montrent aucune différence entre la lignée 293T saine et la lignée 293T transfectée par le vecteur ciblant le domaine FAT, signifiant que ce vecteur est probablement non fonctionnel (non montré). On observe par contre une différence entre la lignée 293T saine et la lignée 293T transfectée par le vecteur ciblant le domaine kinase (Figure 13A).

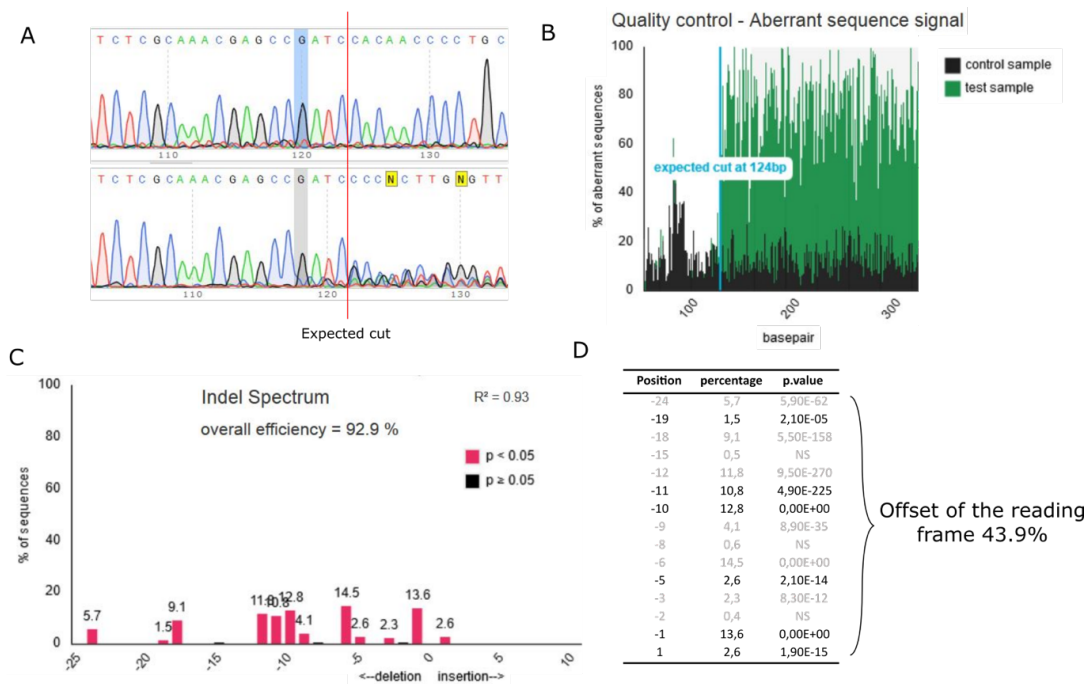


Figure 13 : Analyse du séquençage après modification par CRISPR. (A) Chromatogramme d'un séquençage par la méthode Sanger d'une lignée 293T saine, et de la lignée 293T isogénique modifiée par CRISPR. La ligne verticale représente la prédiction du point de coupure par le CRISPR. (B) Qualité du signal de séquençage de la lignée saine (noir) et modifiée par CRISPR (vert). La ligne verticale représente la prédiction du point de coupure par le CRISPR. (C) Evaluation du spectre d'insertions et de délétions au sein de la lignée 293T modifiée par CRISPR. (D) Visualisation de la proportion d'insertions et de délétions détectés significativement par le logiciel TIDE décalant le cadre de lecture (noir), et ceux non significatifs ou ne décalant pas le cadre de lecture (gris).

Le logiciel en ligne TIDE (*Tracking of Indels by Decomposition*, [Brinkman et al, 2014](#)) a été utilisé pour analyser la décomposition du signal chromatographique. Les signaux sont de bonne qualité et la position de la coupure attendue est concordante avec celle visualisée (Figure 13B). Le pourcentage d'insertion est calculé à 2,6%, et le pourcentage de délétions à 90,3%, retrouvant une efficacité globale du vecteur de 92,9% (Figure 13C). La visualisation de ces différents pourcentages permet d'éliminer les indels d'un nombre de bases multiple de 3 qui ne décalent pas le cadre de lecture et les indels dont le calcul du pourcentage n'est pas significatif (Figure 13D). On retrouve que 43,9% des cellules ont un décalage du cadre de lecture, et induisent donc potentiellement un KO de la protéine ATM.

Le vecteur dont l'efficacité a été prouvée dans les 293T est ensuite transfecté dans plusieurs lignées LCL-WT afin d'induire un KO d'ATM. La dose minimale de puromycine tuant 100% des cellules saine a préalablement été déterminée par dilutions sériées. La sélection par puromycine a tué toutes les lignées LCL-WT transfectées, signifiant que le vecteur n'a pas été exprimé dans ces cellules. Plusieurs méthodes de transfection ont été essayées : par XtremeGENE HP (Roche), par Lipofectamine 2000 (Invitrogen), par électroporation (Nucleofactor, Amaxa) ou par Polyéthylène-imine (PEI). Aucune de ces méthodes de transfections n'a permis la survie de cellules après l'étape de sélection par puromycine. Enfin, la transduction virale a été essayée en utilisant la même sonde et le vecteur LentiCrisprV2 qui contient une cassette GFP. Les LCL-WT ont été transduites puis analysées pour l'expression de la GFP, qui ne retrouve pas de cellules GFP positives (données non montrées). Pour vérifier que la transduction a été réalisée dans des conditions optimales, un virus plus petit contenant une cassette GFP et la Cas9 seule, ayant déjà été validée au sein du laboratoire, a été testé sur une lignée LCL-WT. Une analyse par FACS montre que seulement environ 3% des cellules sont GFP positives (Figure 14). Ces cellules ont ensuite été isolées et remises en culture, puis la fluorescence de la GFP a été mesurée 2 semaines plus tard après expansion et ne retrouve aucune cellule GFP positive (non montré). Le chevauchement de l'expression de la GFP entre la lignée transduite et la lignée contrôle étant très grande, une quantité non négligeable de faux positifs a pu être triée et a pu prendre un avantage prolifératif sur les cellules transduites.

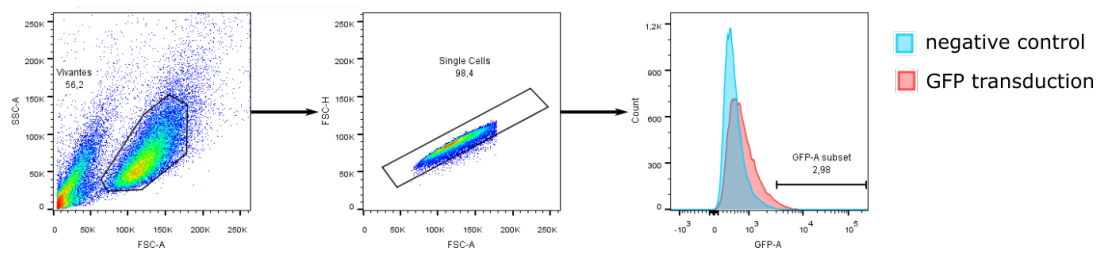


Figure 14 : Efficacité de la transduction sur une lignée LCL-WT. La fluorescence est analysée après transduction d’une lignée LCL-WT par un vecteur contenant une cassette GFP préalablement validée au sein du laboratoire.

Les lignées LCL se révèlent donc très difficilement transfectables et transductibles. Malgré un temps important de travail sur cette partie, nous n’avons pas réussi à établir des lignées LCL modifiées par le système Crispr/Cas9.

CHAPITRE 2 :

ARTICLE

1. Mise en contexte

L'expression des gènes cellulaires et viraux de 5 lignées LCL-WT et 7 lignées LCL-AT ont été analysés par RNA-seq, avec une profondeur de séquençage de l'ordre de 70 millions de reads, pour explorer les voies de signalisation différenciellement exprimées impliquant à la fois le génome cellulaire et viral. L'analyse des résultats a fait l'objet d'une soumission de publication dans *Journal of Virology*. Le papier soumis est joint ci-dessous, avec les figures supplémentaires. La taille considérable des tableaux supplémentaires empêche leur inclusion dans ce manuscrit.

Rectification (août 2019) : L'éditeur de *Journal of Virology* a refusé la publication de l'article dans son état actuel. Une version plus courte de l'article a de nouveau été soumise dans *Orphanet Journal Of Rare Diseases*.

2. Article

Gene Expression Analysis in EBV-infected Ataxia-telangiectasia Cell lines by RNA-Sequencing Reveals Protein Synthesis Defect and Immune Abnormalities

Moussab TATFI¹, Emeline PERTHAME^{4§}, Kenzo-Hugo HILLION^{4§}, Marie-Agnès

DILLIES⁴, Hervé MENAGER⁴, Olivier HERMINE^{1, 2, 3}, Felipe SUAREZ^{1, 2, 3*}

1. INSERM U1163/CNRS ERL8254 - Laboratory of cellular and molecular mechanisms of hematological disorders and therapeutic implications, IMAGINE Institute, Paris, France.
2. Department of adult hematology, Necker – Enfants Malades University Hospital, AP-HP, Paris, France.
3. Université Paris Descartes, Paris Sorbonne Cité, Paris, France
4. Bioinformatics and Biostatistics Hub – C3BI, UST 3756 IP CNRS, Institut Pasteur, Paris, France

§ These authors contributed equally to this study

* Address correspondence to Felipe SUAREZ, felipe.suarez@aphp.fr

Running title: ATM impacts cellular and EBV gene expression

Key words: EBV, ATM, ataxia, RNA-seq, lymphoma

Conflicts of interest: We declare that we have no conflicts of interest.

ABSTRACT

Epstein-Barr virus (EBV) targets B-cells where it establishes a latent infection. EBV can transform B-cells *in vitro* and is recognized as an oncogenic virus, especially in the setting of immune compromise. Indeed, immunodeficient patients may fail to control chronic EBV infection, leading to the development EBV-driven lymphoid malignancies. Ataxia telangiectasia (AT) is a primary immune deficiency caused by mutations in the *ATM* gene, involved in the repair of double-strand breaks. Patients with AT are at high risk of developing cancers, mostly B-cell lymphoid malignancies, most of which being EBV-related. The immune deficiency associated with AT may not be the only explanation for the increased incidence of EBV-related malignancies. The loss of ATM function could therefore hinder the control of the virus, favoring lymphomagenesis.

We used RNA sequencing on lymphoblastoid cell lines derived from patients with AT and healthy donors to analyze and compare both cellular and viral gene expression. We found numerous deregulated signaling pathways involving transcription, translation, oncogenesis and immune regulation. Specifically, the translational defect was confirmed *in vitro*, suggesting that the pathogenesis of AT may also involve a ribosomal defect. Concomitant analysis of viral gene expression did not reveal significant differential gene expression, however, analysis of EBV interactome suggests that the viral latency genes EBNA-3A, EBNA-3C and LMP1 may be disrupted in LCL from AT patients.

IMPORTANCE

EBV is a ubiquitous herpesvirus infecting approximately 95% of the adult population worldwide. EBV causes infectious mononucleosis and persists throughout lifetime in most individuals. However, EBV can lead to malignancies in some patients, especially those with immunodeficiency. Ataxia telangiectasia (AT) is a primary immune deficiency characterized by a biallelic mutation in the *ATM* gene, which plays a role in DNA double strand break repair. AT patients have a high risk of malignancies, especially EBV related lymphomas, but immunodeficiency may not be the sole mechanism to explain this increased incidence. In this study, we used RNA sequencing to characterize both the cellular and viral gene expression profiles in EBV-transformed B-cells. Our data support the notion that *ATM* deficiency deregulates cellular gene expression possibly disrupting interactions with EBV latent genes, promoting the oncogenic potential of the virus. These findings provide a new step towards the understanding of EBV regulation and of AT pathogenesis.

INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is a human *Herpesviridae* that infects about 95% of adults worldwide. Most genes encoded by the viral genome are expressed during the lytic cycle and contribute to the production of viral particles. By contrast, only a restricted repertoire of viral genes is expressed during latency, to allow a lifelong persistence of the virus in the organism. EBV's lytic cycle takes place in the oropharyngeal epithelium whereas the latent cycle is established in the B lymphocytes from the underlying lymphoid tissues (1). The different phases of EBV infection are thoroughly controlled throughout the life of the infected host, and chronic infection in immunocompetent individuals is generally asymptomatic (2). However, inefficient control of viral latency contributes to the development of malignancies such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma and Nasopharyngeal carcinoma.

Several primary immune deficiencies (PID) are associated with poor EBV responses and are also at high risk for EBV-related malignancies (3). Indeed, inherited genetic abnormalities causing these PID are often associated with a poor or absent anti-EBV immune response. Ataxia telangiectasia (AT) is a rare PID caused by mutations in the *Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)* gene, involved in the DNA damage response (DDR). AT patients have an increased risk of cancer, mostly B-cell lymphoid malignancies, many of which are related to EBV (4).

The prevailing hypothesis to explain the increased incidence of malignancies in patients with AT is based on the role of the ATM kinase in the DDR (5). However, the strong association of lymphomas with EBV also suggests an oncogenic role of the latter in the development of B-cell lymphoid malignancies. AT patients often present with antibody deficiency and T-cell lymphopenia but overt immunodeficiency is uncommon, and most patients do not present with opportunistic infections (6). This raises the hypothesis that the lack of ATM function in AT patients may be associated with a less stringent control of EBV latency in ATM-deficient B cells, thereby promoting the oncogenic properties of the virus.

Besides DNA repair, ATM is also involved in a multitude of signaling pathways such as cell cycle checkpoint, apoptosis, oxidative stress, mitochondrial metabolism and telomere maintenance (7). In addition, ATM is involved both in transcription induction (8), and in transcription inhibition in the vicinity of a double-strand break, whether it is situated in nuclear DNA (9) or ribosomal DNA (10). By its multiple functions, ATM intervenes in the control of the latent cycle of Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) and Murine γ -herpesvirus 68 (MHV68), both related to EBV (11, 12).

To assess the involvement of ATM in the regulation of EBV latent cycle, we performed an unbiased RNA sequencing (RNA-seq) on lymphoblastoid cell lines (LCL) generated from AT patients and healthy donors, to explore the specific expression pattern of both the cellular and viral genomes.

RESULTS

RNA-seq generates high-quality datasets and identifies differentially expressed genes.

We conducted a deep and unbiased RNA-seq study on seven LCL from AT patients (LCL-AT) and five LCL from healthy donors (LCL-WT), using Illumina HiSeq 2500 technology (Fig. 1A). An average of 82 million paired-end reads were generated per sequenced sample (range 64-138 millions). Mapping on the human genome (GRCh38) and the viral genome (V01555.2) gave an average of 63% (range 56-76%) and 0.19% (range 0.10-0.44%) of mapped reads respectively (Fig. 1B). A total of 30,794 transcripts were detected using a threshold of one transcript in at least one sample, including 30,687 on the human genome and 107 on the viral genome. Principal component analysis (PCA) shows that LCL-AT and WT segregate into two distinct groups (Fig. 1C).

1899 (6.2%) of the genes were differentially expressed (adjusted p-value <0.05), among which 941 (49.5%) had an absolute log₂ fold-change $|\log_{2}FC| > 1$. These genes and their corresponding fold-changes are given in Supplemental Table 1. A heatmap of the DE genes with $|\log_{2}FC| > 1$ with an unsupervised hierarchical clustering also demonstrates a separation of the 2 groups (Fig. 1D). Of the 1899 DE genes, 875 were upregulated and 1024 were downregulated in AT (Fig. 1E).

Analysis of the cellular genome.

1. Gene ontology (GO) analysis identifies perturbed processes in LCL-AT

We applied the over-representation tool from the PANTHER classification system to the list of DE genes. 1703/1899 (90%) DE genes were annotated in the GO-database. Over-represented categories were determined for biological process, molecular function, cellular component and Reactome Pathways. An over-represented GO-category is a category significantly more highly represented in the DE gene list than would be expected by chance (13). This resulted in a total of 38 over-represented GO-categories (Fig 2A-C) and 1 Reactome Pathway (supplemental Fig 1B). 11 GO categories corresponding to cellular component were judged as too general and non-informative, and were eliminated for better clarity (supplemental Fig 1A).

Interestingly, 16 GO-categories (42%) corresponding to RNA transcription were over-represented in the DE genes list. Among these GO-categories, 8 are related to rRNA synthesis such as rRNA processing (GO: 0006364), ribosome biogenesis (GO: 0042254) or preribosome (GO: 0030684), and 8 are related to general RNA transcription such as RNA binding (GO: 0003723), gene expression (GO: 0010467) or RNA processing (GO: 0006396). The Reactome pathway « rRNA modification in the nucleus and cytosol » (R-HSA-6790901) was also over-represented in the DE gene list (supplemental Fig 1B). This suggests that LCL-AT differ from

LCL-WT in RNA transcription and translation. From the perspective of cellular component, the mitochondrial part was over-represented with 4 GO-categories (11%) suggesting a mitochondrial dysfunction in LCL-AT.

2. Translational defect.

We further analyzed the GO-categories pertaining to RNA transcription and to mitochondria. We isolated the gene list pertaining to the 8 GO-categories related to general transcription, the 8 GO-categories related to rRNA and, using annotations from BioMart tool, all DE genes described as mitochondrial, including nuclear and mitochondrial encoded genes. A heatmap for each of these gene sets was generated (Fig 2D-F) and shows that LCL-AT have a defect in ribosome and transcription-related gene expression, and in mitochondrial genes. Interestingly, several downregulated mitochondrial genes are also related to mitochondrial ribosomes. Gene lists related to each heatmap are given in Supplemental Table 2.

We hypothesize that a transcriptional defect in LCL-AT could have an impact on the amount of ribosomal RNA (rRNA). The rRNA fraction of the RNA prepared prior to RNA-seq was analyzed by capillary gel electrophoresis. LCL-AT have a slightly lower percentage of rRNA than LCL-WT (supplemental Fig 2A). Among these rRNAs, we observe a significant decrease in the percentage of the 28S RNA and 28S+18S RNA (Fig 2G) but no difference for the 18S RNA (Supplemental Fig 2B). The standard deviations of the LCL-WT were very narrow compared to those of the LCL-AT. The RNA degradation state was assessed by calculating the 28S/18S ratio and by determining the RNA integrity number (RIN). Both methods showed that RNA was of good quality and that there was no difference in RNA degradation between LCL-AT and LCL-WT. Thus, the decrease in 28S RNA cannot be imputed to RNA degradation (Supplemental Fig 2C-D).

Transcription and translation rates were assessed by incubating LCL-WT and LCL-AT with 5-ethynyl uridine (EU), an RNA nucleotide analogue, or with O-Propargyl-puromycin (OPP), an agent incorporated during translation. EU incorporation did not show any significant difference in the transcription rate between LCL-WT and LCL-AT (Fig. 2H) but OPP incorporation showed a significant decrease (p-value < 0.05) in protein synthesis rate in LCL-AT (Fig. 2I). These results show that LCL-AT have a generalized protein synthesis defect. Mitochondrial respiration was also assessed by SeaHorse analysis but did not show any difference between LCL-WT and LCL-AT (data not shown).

3. Gene set analysis identifies oncogenic phenotypes and immune abnormalities in LCL-AT.

In order to further analyze the DE gene pathways, we performed the Ensemble of Gene Set Enrichment Analyses (EGSEA). This tool combines 12 different algorithms and explores the MSigDB, GeneSetDB and KEGG databases to give significantly enriched Gene-Sets (GS) from an imputed gene list (14). Given the large amount of data generated (Supplemental table 3), we kept only GS with adjusted p-value <0.05 and absolute average log₂ fold-change ($|\text{avg.logfc.dir}| > 2$, corresponding to the average of logFC at the GS level defined for the genes regulated in the same direction as the GS (Fig 3).

Among the DE-GS, GS related to cancer were particularly enriched. In the oncogene GS category, DE genes were enriched in the signature of the KRAS-dependent Prostate Cancer both in the upregulated and downregulated signature. This trend was also corroborated by the GS “Neoplasm” and “Breast Cancer”. However, GS related to telomere maintenance was found to be significantly downregulated in LCL-AT. Other GS categories related to cancer include growth factor receptors and tumor suppressors.

DE-GS related to immunity were also particularly deregulated in LCL-AT, suggesting that LCL-AT may have immunological disorders. There was also a high enrichment of cytokines

and interleukin GS in LCL-AT. Interestingly, LCL-AT gene expression was closer to that of Memory B-cells than in LCL-WT, both in the upregulated and downregulated signature of Memory B-cells versus naïve B-cells. LCL-AT are therefore in a more differentiated state than LCL-WT. Other DE-GS related to immunity included NK-cell cytotoxicity, abnormal innate immunity or abnormal level of class II molecules (Fig. 3).

Analysis of the viral gene expression.

The normalized viral counts were viewed using the IGV software (Fig. 4A). A zoom on an intergenic region showed no reads, supporting the fact that there were no contaminating reads from cellular DNA (supplemental Fig 3). The AT2, AT4 and AT6 lines express more viral transcripts than the other lines (Fig 4B). This difference in viral genes expression could be explained by a difference in lytic cycle induction between all lines at the time of RNA extraction. Indeed, there is always 0.1 to 4% of cells undergoing lytic cycle (15). EBV-infected cells in the latent phase only express 9 latent genes and 2 non-coding EBERs, whereas during the lytic cycle the cells express a hundred of lytic genes under the control of BZLF1, the lytic cycle master-gene regulator (16). Knowing that cells in latent cycle express little viral RNA, a small difference in the proportion of cells undergoing lytic cycle would be enough to drastically change the total number of viral transcripts expressed in each line. To verify this, we looked at the expression of BZLF1 and saw that its expression follows exactly the same pattern (Pearson correlation = 0.97) as the total viral counts (Fig. 4C).

The variable pattern of lytic reactivation among the cultures precludes any assumption on DE lytic gene expression. We hypothesize that, although lytic cycle gene expression cannot be analyzed, we can still study latent gene expression. Indeed, if a small proportion of cells is undergoing lytic reactivation, the majority of cells still remain in a latent state. This small proportion, although variable, would not be enough to significantly modify the latent genes

expression. To test this hypothesis, we downloaded 464 EBV standardized read counts from the EBV Portal platform (17), which gather EBV RNA-seq results of LCL-WT sequenced within the 1000 genome project. We established 4 quartiles according to BZLF1 expression, (Fig. 4F). Total and latent viral counts were calculated as the sum of all viral counts and latent counts respectively for each quartile. We saw that total viral counts depend on BZLF1 expression, with a significant increase in total viral counts between each quartile (Fig. 4G). On the other hand, latent viral count doesn't depend on BZLF1 expression, because there is no significant difference in latent gene expression between each quartile (Fig. 4H). This approach on the 464 LCL-WT study shows that although there is a big difference in total viral counts, these counts are relative to of BZLF1 expression and have no link with latent counts. This allows us to analyze latent genes, regardless of lytic genes expression.

Differential analysis of latent genes did not give any DE genes between LCL-AT and LCL-WT (Fig 4D-E). All latent genes were expressed in LCL-WT and LCL-AT, despite a great heterogeneity in the expression of latency genes. In order to analyze the influence of the latent genes expression on the cellular transcriptome, we compared the DE genes list with non-redundant latent genes interactome available on the Polygenic pathways database. From this analysis we found 71 interactions representing 54 DE genes, of which 42 have an $|\log_{2}FC| > 1$. Of these 71 interactions, EBNA-3A appears to interact with 39 DE genes (Fig 5A), EBNA-3C with 11 DE genes (Fig 5B) and LMP1 with 11 DE genes (Fig 5C). These data suggests that although the EBNA-3A, EBNA-3C and LMP1 transcripts were not DE, the activity of these genes may be disrupted in LCL-AT. Interestingly, most of the DE genes described as downregulated or upregulated by EBNA-3A were also downregulated or upregulated in LCL-AT respectively, indicating that EBNA-3A may be more active in LCL- AT than in LCL-WT.

DISCUSSION

AT patients have a high risk of developing lymphoid malignancies, mostly B-cell non-hodgkin lymphomas and Hodgkin lymphomas with a high rate of association with EBV. However, the majority of AT patients do not present with marked cellular immune deficiency that could explain this susceptibility. We raised the hypothesis that ATM defect in EBV-infected cells could play a role *per se* in the control of EBV latency, favoring a latent program more prone to lymphomagenesis (18). In the present study, we used strand-specific RNA seq strategy to profile the RNA expression landscape of ATM deficient LCL versus control, in order to assess the involvement of ATM in EBV latent cycle regulation.

Our data suggests a previously unsuspected ribosomal defect in LCL-AT. In addition, we found that LCL-AT display a distinct pattern of cancer associated gene expression, most notably by overexpressing certain oncogenes and downregulation of tumor suppressors, and also exhibit features of immune dysfunction. Our comparison with data from the EBV portal database confirms that latent gene expression can be studied regardless of lytic genes, which, to our knowledge, has not been previously validated. Here we discuss the importance of the results toward the understanding of EBV-related cancer susceptibility in Ataxia-Telangiectasia.

1. Transcription and translation

The GO analysis and results visualization showed that LCL-AT may have a transcriptional and translational defect. LCL-AT also express less 28S RNA and have a lower translational rate than LCL-WT. Interestingly, the signaling pathways for transcription and translation were not found in the EGSEA results with the stringent filters used. However, they stand out significantly with a lower log.fold.dir. The choice of $|\log.\text{fold.dir}| > 2$ was made to focus the most deregulated gene sets or pathways within the large amount of data delivered by EGSEA. This underscores

the need for several complementary methods to study RNA-seq data. However, analysis of the transcription capacities did not show any difference between LCL-AT and LCL-WT. Highly expressed DE genes were exclusively downregulated in LCL-AT, but housekeeping genes were not DE. Transcriptional alterations may thus only affect specific genes such as ribosomal genes. The ribosomal transcription rate should be studied to verify this allegation. The possible transcriptional defect does not appear to affect EBV latency genes, as observed by the absence of DE latency genes between the LCL-AT and LCL-WT.

These results suggest that the pathophysiology of Ataxia-Telangiectasia may also include aspects of ribosomal disease. The nucleus morphology is known to be altered in LCL-AT, but the nucleolus structure has, to our knowledge, never been assessed. ATM is present in the nucleolus and is involved in the inhibition of RNA polymerase I-mediated transcription in case of double-strand break within rDNA. ATM enables the migration of these lesions to the nucleolar periphery, forming “nucleolar caps”, to facilitate the access of DNA repair factors(19). The implication of ATM in the nucleolus and particularly in basal nucleolar transcription has been suggested (20).

The small but significant decrease in translation capabilities of LCL-AT may explain the distinctive susceptibility of AT patients to EBV associated lymphoid malignancies. Other immunodeficiencies with specific susceptibility to EBV – such as *CTPS1* deficiency (21) – are characterized by altered nucleic acid metabolism leading to rapid T-cell exhaustion upon massive proliferation induced by EBV infection. These patients may respond normally to mild stimulation of the immune system, but their immune system is rapidly exhausted when subjected to intense proliferative stress caused by EBV. We hypothesize that the massive protein synthesis rate in cytotoxic T-cells during EBV-driven proliferative stress is inefficiently sustained in Ataxia-Telangiectasia, resulting in a defective control of EBV. Further studies are needed to address this hypothesis.

2. Mitochondria

We also found that transcription of many mitochondrial genes was decreased in LCL-AT. These included several genes involved in the respiratory chain and in ribosomal protein synthesis. These data confirm that LCL-AT may have a mitochondrial respiration defect (22). It is known that inhibition of ATM produces continuous ROS due to mitochondrial dysfunction (23). These ROS could be involved in the increased incidence of cancers in patients with Ataxia-Telangiectasia. In addition, despite ATM being involved in mitochondrial biogenesis by activation of the AMPK pathway (24), we were not able to see any differences between LCL-WT and LCL-AT after assessing mitochondrial respiration and metabolism by SeaHorse.

3. Oncogenesis

The EGSEA results show enrichment in pro-tumorigenic GS particularly oncogenes, tumor suppressors and growth factors in keeping with the increased cancer risk in AT (25). Among the main oncogenes induced in LCL-AT, we find BCL11A (logFC: 4.20), a modulator of transcriptional repression frequently upregulated in B-cell malignancies (26, 27), TCL1A (logFC: 3.41), a survival promoting factor strongly associated with Burkitt lymphoma and related to other malignancies (28, 29), or SOX5 (logFC: 3.41), a transcription factor involved in follicular lymphoma (30). The main tumor suppressors downregulated in AT are PCDH10 (logFC: -4.76), a protocadherin whose promoter is methylated in most diffuse large B-cell lymphomas (31), PTPN13 (logFC: -2.84), an inhibitor of FAS-induced apoptosis implicated in the aggressiveness of breast cancer (32), or DLC1 (logFC: -2.96), a cytoskeletal reorganizer repressed in multiple cancers (33) and in almost all nasopharyngeal carcinoma cell lines (34). These data confirm the fundamental role of ATM as a guardian of genome stability. Indeed, ATM is inactivated in multiple cancers such as mantle cell lymphoma, T-cell prolymphocytic

leukemia, diffuse large B-cell lymphomas, and chronic lymphocytic leukemia (35). The virus could also be implicated in the oncogenic phenotype observed. However, the contribution of the virus to the oncogenic phenotype of AT needs to be further explored.

Despite this great modulation of oncogenes and tumor suppressors, we were surprised to see that the telomere maintenance pathway was downregulated in LCL-AT. TERT gene, encoding the human telomerase, was particularly downregulated (logFC: -4,78). Inhibition of TERT in LCL normally induces a decrease in proliferation and an increase in apoptosis in an ATM dependent manner (36). LCL-AT do not seem to proliferate slower than LCL-WT (data not shown). There is an alternative lengthening of telomeres pathway (37) that could be used in LCL-AT. Interestingly, it has been shown that inhibition of TERT induces the lytic cycle of the virus, which does not seem to be the case in LCL-AT. The induction of lytic cycle after inhibition of TERT is probably also ATM dependent.

4. Plasma cell phenotype

The EGSEA results suggested that LCL-AT were more differentiated than LCL-WT, with a transcriptome closer to that of the plasma cells. Indeed, retinoic acid (RA) which is involved in plasma cell differentiation (38) was induced in LCL-AT. Among the RA-induced genes, there was PBX2 (logFC: 6.72, (39)), GATA4 (logFC: 4.96, (40)) or PITX2 (logFC: 4.85, (41)). Interestingly, DHRS9, an enzyme that mediates conversion of retinol into RA was highly upregulated in LCL-AT (logFC: 4.19). DHRS9 is also known to be induced by EBV (42). Notch signaling is known to be necessary for the terminal differentiation of B-cells into plasma cells (43). Although NOTCH was not DE, the MAGE family of proteins, which are NOTCH transactivation inhibitors, were very downregulated in LCL-AT: MAGE A1, A3, A12, B4 and C1 (logFC of -7.45; -7.50; -7.35; -6.83; -3.30 and -5.10 respectively). LCL are known to express CD4, but the differentiation of these cells represses its expression via the repression of ASCL1

(44). CD4 and ASCL1 were also very downregulated in LCL-AT (logFC: -4,16 and -3,51 respectively). Finally, the normal decrease of CD36 during plasma cell differentiation is also observed in LCL-AT (logFC: -3.98). Despite the fact that BLIMP1, the major transcription factor involved in plasma cell differentiation was not DE, these elements look consistent with a differentiation state in LCL-AT closer to that of the plasma cell than in LCL-WT.

5. Immune dysfunction

A modulation of innate immunity in LCL-AT is suggested by several DE-GS. HLA-C is upregulated in LCL-AT (logFC: 5.63). Other NK cells inhibitory molecules such as CD200R1, CD276, SLAMF7 and LILRB1 were found upregulated in LCL-AT. On the other hand, LAIR1, another NK cell inhibitory molecule, is very downregulated in LCL-AT (logFC: -4.99). These data show that there may be a probable dysfunction in NK-cell mediated lysis of LCL-AT.

Intracellular antiviral immunity also seems to be decreased in LCL-AT. The cGAS and STING (TMEM173) (45) transcripts are decreased in LCL-AT (logFC: -0.70 and -2.39 respectively). The interferon beta 1 (IFNB1) expression is also downregulated in LCL-AT (logFC: -2.51). These data suggest that LCL-AT may have a defect in antiviral response.

Similarly, IL4 and IL10 were upregulated in LCL-AT (logFC: 2.23 and 3.58, respectively). These two cytokines participate in the proliferation, plasma cell differentiation and antibody production of B lymphocytes (46, 47). IL10 also inhibits CD8 cytotoxic T-cells (48).

6. EBV regulation

Despite the low level reactivation of the lytic cycle in a fraction of LCL that can significantly contribute to the overall EBV-induced genes, our results show that latent genes can nevertheless be analyzed.

We found no significant difference in EBV latent gene expression between LCL-AT and LCL-WT. However, several deregulated cellular genes in LCL-AT interact with EBNA-3A, EBNA-3C and LMP1 suggesting an overall differential impact on cellular homeostasis.

ATM participates in the regulation of EBV's lytic cycle and is necessary for a proper viral replication (49). Recent studies have reported inhibition of viral replication after pharmacological inhibition of ATM in epithelial cell lines (50). However, ATM inhibition in LCL through caffeine treatment did not affect viral replication (51). In our LCL-AT, we did not observe inhibition of the lytic cycle. On the contrary, 3 LCL-AT out of 7 seem to have a greater proportion of cells undergoing lytic cycle than LCL-WT. On the other hand, LCL treated by the pan-PIKK inhibitor (to which the ATM kinase belongs) LY294002 were shown to inhibit viral replication. It is thus possible that another kinase compensates for ATM deficiency in LCL-AT, to promote viral replication. ATR is a good candidate as it activates the same downstream targets as ATM.

7. Conclusion

In summary, we show that LCL-AT display a gene expression pattern consistent with the observed increased incidence of EBV-related malignancies in patients with Ataxia-Telangiectasia. Several dysregulated pathways uncovered by this approach need to be further explored to better understand the cell intrinsic mechanisms involved in the regulation of EBV latency and lymphomagenesis. Elucidation of these pathways may contribute to the development of novel approaches to treat or prevent EBV associated lymphoproliferations in AT patients where conventional chemotherapy is very toxic because of the DDR defect, but also in the general population.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture. LCL were generated according to standard protocols at the Genethon Laboratory and at the Imagine Institute Biological Resource Center. Briefly, blood from patients with Ataxia-Telangiectasia and from healthy donors were taken after free and informed consent according to ethical guidelines. Mononuclear cells were extracted and put in the presence of B95-8 EBV strain with ciclosporin. The culture is then left 2 weeks and progressively passed to obtain stable lines for laboratory use.

LCL were maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. LCL were cultured in RPMI medium (RPMI 1640, Gibco) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), 2 mM L-glutamine (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin solution (Sigma). LCL were passed every 3 days replacing half of the culture medium with fresh medium.

RNA extraction and integrity analysis. LCL-WT and LCL-AT were harvested in an exponential growth phase and washed twice with PBS. Total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen). The concentration of total RNA was measured spectrometrically using Xpose (Trinean). The RNA integrity was analyzed by capillary electrophoresis using a Tape-Station (Agilent). Only samples with RNA Integrity Number (RIN) greater than 9 were retained for further processing.

cDNA library preparation. The NUGEN Ovation Universal RNA-Seq system was used to construct the RNA-seq libraries from 100 ng of total RNA. Briefly, total RNA was retro-transcribed in single-stranded cDNA and the second strands were synthesized. Human ribosomal primers were added to allow the subsequent depletion of ribosomal RNA. Total cDNA was fragmented using a S220 Focused-ultrasonicator (Covaris). The fragments' ends were repaired and ligated with labeled adaptors. Cleavage of the adaptors were induced to allow

depletion of ribosomal transcripts. Finally, the RNA-seq libraries were amplified by PCR, with a monitored number of cycles to reduce amplification bias.

Sequencing. RNA sequencing was performed by the genomics platform of Imagine Institute on HiSeq 2500 (Illumina), by multiplexing 12 libraries per line to obtain a sequencing depth of 70 million pair-end reads per library, with a read length of approximately 130 nucleotides. Bases and quality values were generated for each read (fastq files).

Reads mapping and quantification. Regarding quality control, FastQC (52) was firstly used to perform quality analysis of FASTQ files. This tool provides assessment of GC content, overabundance of adaptors and overrepresented sequence. Reads were cleaned for Illumina adaptors with Cutadapt (53). Next, we used Salmon v0.8.2 (54) to pseudo-align raw RNA-seq reads to both human and viral genomes. This quantification tool is able to retain multi-mapped reads, which makes it well-suited to account for overlapping regions in the EBV genome. Salmon was run with default parameters to get quantification estimates at the transcript level of both human and EBV genomes. Salmon relies on the use of raw sequencing reads, and an index built from transcript sequences to quasi-map RNA-seq reads in the quantification step. This index was built by merging human and viral references into a single GFF file. The human reference genome assembly GRCh38 was downloaded from the ENSEMBL Genome (55) FTP site (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-92/fasta/homo_sapiens/cdna/), and the EBV genome was downloaded from Flemington Lab (<http://www.flemingtonlab.com/rnaseq.html>, B95-8/Raji genome and B95-8/Raji BED annotation).

Differential analysis. Differential analysis was performed using R software, version 3.5.0 (56) and the negative binomial generalized linear modelling (GLM) implemented in DESeq2 package version 1.20.0 (57). Normalisation was performed by firstly computing size factors on

human transcripts and then used to normalise viral counts in order to satisfy normalisation assumptions underlying DESeq2 model. Default parameters were set for dispersion estimation as well as outlier detection and low expressed genes. The statistical model was adjusted on the cell type only. A Wald test was applied on viral transcripts to perform comparisons among conditions. P-values were corrected for multiple testing using Benjamini-Hochberg correction (58) with a level alpha set to 0.05. The BioMart R package was used to annotate human differentially expressed genes.

Genome visualization. For this part of the analysis, the reads were first mapped on the human genome (hg38) using STAR v2.5.0a (59). The unmapped reads were then aligned to the EBV genome (Flemington Lab) using bowtie2 v2.3.4.2 (60), a more convenient mapper adapted to small genomes. The snapshots obtained in Fig 4A and Supplemental Fig 3 were obtained with IGV v2.4.15 (61). The format conversions, sorting, and indexing intermediate operations on the data were performed using samtools v1.7(62) and bedtools v2.26 (63). The workflow describing the mapping of unmapped reads and the production of the IGV snapshots has been automated with a CWL (64) workflow.

Gene Ontology analysis. Differentially expressed genes were subjected to GO-Analysis, using the over-representation test within the Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships (PANTHER, version 13.1) classification system (65), which is maintained up to date with GO annotations. This tool uses a Fisher's Exact test with false discovery rate (FDR) multiple test correction to compare an imputed gene list with a reference gene list from the PANTHER database, for each defined GO term or Reactome pathway (66). Statistically over-represented GO-categories (FDR < 0.05) containing less than 25% of the input were selected for visualization.

Gene Sets analysis. Functional analysis was carried out using the Ensemble of Gene Set Enrichment Analyses (EGSEA) R package (version 1.8.0). EGSEA uses 12 algorithms (Camera, Roast, Safe, Gage, Padog, Beach, Zscore, Gsva, Ssgsea, Globaltest, Ora and Fry) and combine the results by calculating a Wilkison adjusted p-value. The EGSEA database consists of approximately 25.000 genes-sets classified into 16 collections from the MSigDB (67, 68), GeneSetDB(69) and KEGG (70) databases.

Transcription and translation assay. Cells were incubated with 5-ethynyl uridine (EU) on 1 hour or with O-Propargyl-puromycin (OPP) on 30 minutes. Transcription and translation rate were assessed using the Click-it assay Kit (Invitrogen), followed by flow-cytometer analysis.

Statistics. Statistical comparison between LCL-AT and LCL-WT were performed using a Mann–Whitney–Wilcoxon non-parametric test, using Prism (version 7.00, GraphPad Software).

1000 genome project analysis. 464 EBV standardized read counts were downloaded on the EBV Portal platform (ebv.wistar.upenn.edu), which regroup EBV RNA-seq results of LCL-WT sequenced within the 1000 genome project.

EBV interactome analysis. EBV interactome data were downloaded from the Polygenic pathways website (www.polygenicpathways.co.uk/ epsteinbarr.htm), which includes 5404 interactions between human and EBV genes, and were compared to the DE gene list from human genome RNA-seq analysis.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Pr Marc Lecuit, Pasteur Institute for helpful discussions. This work was supported in part by grants from Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (France), Fondation ATEurope (France) and Le Centre de Référence Déficiets Immunitaires Héritaires (CEREDIH, France).

REFERENCE

1. Young LS, Rickinson AB. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4:757–68.
2. Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. 1995. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells *in vivo*. *Cell* 80:593–601.
3. Cohen JI. 2015. Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 390:241–265.
4. Suarez F, Mahlaoui N, Canioni D, Andriamanga C, Dubois d'Enghien C, Brousse N, Jais J-P, Fischer A, Hermine O, Stoppa-Lyonnet D. 2015. Incidence, presentation, and prognosis of malignancies in ataxia-telangiectasia: a report from the French national registry of primary immune deficiencies. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 33:202–208.
5. Lavin MF. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:759–769.
6. Nowak-Wegrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM. 2004. Immunodeficiency and infections in ataxia-telangiectasia. *J Pediatr* 144:505–511.
7. Shiloh Y, Ziv Y. 2013. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14:197–210.
8. Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316:1160–1166.
9. Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA. 2010. ATM-Dependent Chromatin Changes Silence Transcription *In cis* to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* 141:970–981.
10. Harding SM, Boiarsky JA, Greenberg RA. 2015. ATM Dependent Silencing Links Nucleolar Chromatin Reorganization to DNA Damage Recognition. *Cell Rep* 13:251–259.
11. Kulinski JM, Leonardo SM, Mounce BC, Malherbe L, Gauld SB, Tarakanova VL. 2012. Ataxia telangiectasia mutated kinase controls chronic gammaherpesvirus infection. *J Virol* 86:12826–12837.
12. Hollingworth R, Skalka GL, Stewart GS, Hislop AD, Blackbourn DJ, Grand RJ. 2015. Activation of DNA Damage Response Pathways during Lytic Replication of KSHV. *Viruses* 7:2908–2927.
13. Beissbarth T, Speed TP. 2004. GStat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinforma Oxf Engl* 20:1464–1465.
14. Alhamdoosh M, Law CW, Tian L, Sheridan JM, Ng M, Ritchie ME. 2017. Easy and efficient ensemble gene set testing with EGSEA. *F1000Research* 6:2010.
15. Vrzalikova K, Vockerodt M, Leonard S, Bell A, Wei W, Schrader A, Wright KL, Kube D, Rowe M, Woodman CB, Murray PG. 2011. Down-regulation of BLIMP1 α by the EBV oncogene, LMP-1, disrupts the plasma cell differentiation program and prevents viral replication in B cells: implications for the pathogenesis of EBV-associated B-cell lymphomas. *Blood* 117:5907–5917.
16. Young LS, Rickinson AB. 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* 4:757–768.
17. Arvey A, Tempera I, Tsai K, Chen H-S, Tikhmyanova N, Klichinsky M, Leslie C, Lieberman PM. 2012. An Atlas of the Epstein-Barr Virus Transcriptome and Epigenome Reveals Host-Virus Regulatory Interactions. *Cell Host Microbe* 12:233–245.
18. Tatfi M, Hermine O, Suarez F. 2018. Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Lymphoproliferative Disorders in Ataxia Telangiectasia: Does ATM Regulate EBV Life Cycle? *Front Immunol* 9:3060.
19. Larsen DH, Stucki M. 2016. Nucleolar responses to DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res* 44:538–544.

20. Smith SC, Hetman M. 2011. ATM is a Novel Regulator of Nucleolar Transcription. *FASEB J* 25:lb34–lb34.
21. Martin E, Palmic N, Sanquer S, Lenoir C, Hauck F, Mongellaz C, Fabrega S, Nitschké P, Esposti MD, Schwartzentruber J, Taylor N, Majewski J, Jabado N, Wynn RF, Picard C, Fischer A, Arkwright PD, Latour S. 2014. CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation. *Nature* 510:288–292.
22. Ambrose M, Goldstine JV, Gatti RA. 2007. Intrinsic mitochondrial dysfunction in ATM-deficient lymphoblastoid cells. *Hum Mol Genet* 16:2154–2164.
23. Reichenbach J, Schubert R, Schindler D, Müller K, Böhles H, Zielen S. 2002. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxid Redox Signal* 4:465–469.
24. Hardie DG, Hawley SA, Scott JW. 2006. AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept. *J Physiol* 574:7–15.
25. Suarez F, Mahlaoui N, Canioni D, Andriamanga C, d'Enghien CD, Brousse N, Jais J-P, Fischer A, Hermine O, Stoppa-Lyonnet D. 2015. Incidence, Presentation, and Prognosis of Malignancies in Ataxia-Telangiectasia: A Report From the French National Registry of Primary Immune Deficiencies. *J Clin Oncol* 33:202–208.
26. Martín-Subero JI, Gesk S, Harder L, Sonoki T, Tucker PW, Schlegelberger B, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Hansmann ML, Dyer MJS, Siebert R. 2002. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99:1474–1477.
27. Weniger MA, Pulford K, Gesk S, Ehrlich S, Banham AH, Lyne L, Martin-Subero JI, Siebert R, Dyer MJS, Möller P, Barth TFE. 2006. Gains of the proto-oncogene BCL11A and nuclear accumulation of BCL11A(XL) protein are frequent in primary mediastinal B-cell lymphoma. *Leukemia* 20:1880–1882.
28. Aggarwal M, Villuendas R, Gomez G, Rodriguez-Pinilla SM, Sanchez-Beato M, Alvarez D, Martinez N, Rodriguez A, Castillo ME, Camacho FI, Montes-Moreno S, Garcia-Marco JA, Kimby E, Pisano DG, Piris MA. 2009. TCL1A expression delineates biological and clinical variability in B-cell lymphoma. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc* 22:206–215.
29. Gaudio E, Paduano F, Pinton S, D'Agostino S, Rocca R, Costa G, Ngankeu A, Aqeilan RI, Croce CM, Bertoni F, Alcaro S, Trapasso F. 2018. TCL1A interacts with TP63 and enhances the survival of Raji Burkitt lymphoma cell line. *Br J Haematol* 183:509–512.
30. Storlazzi CT, Albano F, Lo Cunsolo C, Doglioni C, Guastadisegni MC, Impera L, Lonoce A, Funes S, Macri E, Iuzzolino P, Panagopoulos I, Specchia G, Rocchi M. 2007. Upregulation of the SOX5 by promoter swapping with the P2RY8 gene in primary splenic follicular lymphoma. *Leukemia* 21:2221–2225.
31. Huang W, Xue X, Shan L, Qiu T, Guo L, Ying J, Lu N. 2017. Clinical significance of PCDH10 promoter methylation in diffuse large B-cell lymphoma. *BMC Cancer* 17:815.
32. Glondou-Lassis M, Dromard M, Lacroix-Triki M, Nirdé P, Puech C, Knani D, Chalbos D, Freiss G. 2010. PTPL1/PTPN13 regulates breast cancer cell aggressiveness through direct inactivation of Src kinase. *Cancer Res* 70:5116–5126.
33. Lukasik D, Wilczek E, Wasitynski A, Gornicka B. 2011. Deleted in liver cancer protein family in human malignancies (Review). *Oncol Lett* 2:763–768.
34. Seng TJ, Low JSW, Li H, Cui Y, Goh HK, Wong MLY, Srivastava G, Sidransky D, Califano J, Steenbergen RDM, Rha SY, Tan J, Hsieh W-S, Ambinder RF, Lin X, Chan ATC, Tao Q. 2007. The major 8p22 tumor suppressor DLC1 is frequently silenced by methylation in both endemic and sporadic nasopharyngeal, esophageal, and cervical carcinomas, and inhibits tumor cell colony formation. *Oncogene* 26:934–944.
35. Choi M, Kipps T, Kurzrock R. 2016. ATM Mutations in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 15:1781–1791.

36. Celeghin A, Giunco S, Freguja R, Zangrossi M, Nalio S, Dolcetti R, De Rossi A. 2016. Short-term inhibition of TERT induces telomere length-independent cell cycle arrest and apoptotic response in EBV-immortalized and transformed B cells. *Cell Death Dis* 7:e2562.
37. Cesare AJ, Reddel RR. 2013. Alternative Lengthening of Telomeres in Mammalian Cells. *Landes Bioscience*.
38. Ross AC, Chen Q, Ma Y. 2011. Vitamin A and retinoic acid in the regulation of B-cell development and antibody production. *Vitam Horm* 86:103–126.
39. Qin P, Haberbush JM, Soprano KJ, Soprano DR. 2004. Retinoic acid regulates the expression of PBX1, PBX2, and PBX3 in P19 cells both transcriptionally and post-translationally. *J Cell Biochem* 92:147–163.
40. Su D, Gudas LJ. 2008. Retinoic acid receptor gamma activates receptor tyrosine kinase Tiel gene transcription through transcription factor GATA4 in F9 stem cells. *Exp Hematol* 36:624–641.
41. Kumar S, Duester G. 2010. Retinoic acid signaling in perioptic mesenchyme represses Wnt signaling via induction of Pitx2 and Dkk2. *Dev Biol* 340:67–74.
42. Jones RJ, Dickerson S, Bhende PM, Delecluse H-J, Kenney SC. 2007. Epstein-Barr virus lytic infection induces retinoic acid-responsive genes through induction of a retinol-metabolizing enzyme, DHRS9. *J Biol Chem* 282:8317–8324.
43. Santos MA, Sarmento LM, Rebelo M, Doce AA, Maillard I, Dumortier A, Neves H, Radtke F, Pear WS, Parreira L, Demengeot J. 2007. Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:15454–15459.
44. Hoennscheidt C, Max D, Richter N, Staeger MS. 2009. Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scand J Immunol* 70:216–225.
45. Härtlova A, Erttmann SF, Raffi FA, Schmalz AM, Resch U, Anugula S, Lienenklaus S, Nilsson LM, Kröger A, Nilsson JA, Ek T, Weiss S, Gekara NO. 2015. DNA Damage Primes the Type I Interferon System via the Cytosolic DNA Sensor STING to Promote Anti-Microbial Innate Immunity. *Immunity* 42:332–343.
46. Moens L, Tangye SG. 2014. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front Immunol* 5:65.
47. Bod L, Douguet L, Auffray C, Lengagne R, Bekkat F, Rondeau E, Molinier-Frenkel V, Castellano F, Richard Y, Prévost-Blondel A. 2018. IL-4-Induced Gene 1: A Negative Immune Checkpoint Controlling B Cell Differentiation and Activation. *J Immunol Baltim Md* 1950 200:1027–1038.
48. Venmar KT, Kimmel DW, Cliffel DE, Fingleton B. 2015. IL4 receptor α mediates enhanced glucose and glutamine metabolism to support breast cancer growth. *Biochim Biophys Acta* 1853:1219–1228.
49. Luo Y, Ye Z, Li K, Chen R, Li S, Pang J. 2015. Associations between polymorphisms in the IL-4 and IL-4 receptor genes and urinary carcinomas: a meta-analysis. *Int J Clin Exp Med* 8:1227–1233.
50. Sun Z, Fourcade J, Pagliano O, Chauvin J-M, Sander C, Kirkwood JM, Zarour HM. 2015. IL10 and PD-1 Cooperate to Limit the Activity of Tumor-Specific CD8+ T Cells. *Cancer Res* 75:1635–1644.
51. Kieff E, Rickinson AB. 2007. Epstein-Barr Virus and Its Replication, p. 2603–2654. *In* Fields Virology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
52. Xu G, Strong MJ, Lacey MR, Baribault C, Flemington EK, Taylor CM. 2014. RNA CoMPASS: A Dual Approach for Pathogen and Host Transcriptome Analysis of RNA-Seq Datasets. *PLoS ONE* 9:e89445.
53. Hagemeyer SR, Barlow EA, Meng Q, Kenney SC. 2012. The cellular ataxia telangiectasia-mutated kinase promotes epstein-barr virus lytic reactivation in response to multiple different types of lytic reactivation-inducing stimuli. *J Virol* 86:13360–13370.

54. Hau PM, Deng W, Jia L, Yang J, Tsurumi T, Chiang AKS, Huen MS-Y, Tsao SW. 2015. Role of ATM in the formation of the replication compartment during lytic replication of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal epithelial cells. *J Virol* 89:652–668.
55. Kudoh A, Fujita M, Zhang L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, Isomura H, Nishiyama Y, Tsurumi T. 2005. Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem* 280:8156–8163.
56. Andrews, S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
57. Martin M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* 17:10–12.
58. Patro R, Duggal G, Love M, Irizarry R, Kingsford C. 2017. Salmon Provides Fast and Bias-Aware Quantification of Transcript Expression. *Nat Methods*.
59. Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. 2018. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res* 46:D754–D761.
60. R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
61. Love MI, Huber W, Anders S. 2014. Moderated estimation of fold-change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* 15:550.
62. Benjamini Y, Hochberg Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57:289–300.
63. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. 2013. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinforma Oxf Engl* 29:15–21.
64. Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359.
65. Thorvaldsdottir H, Robinson JT, Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* 14:178–192.
66. Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R, 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinforma Oxf Engl* 25:2078–2079.
67. Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinforma Oxf Engl* 26:841–842.
68. Amstutz P, Crusoe MR, Tijanić N, Chapman B, Chilton J, Heuer M, Kartashov A, Leehr D, Ménager H, Nedeljkovich M, Scales M, Soiland-Reyes S, Stojanovic L. 2016. Common Workflow Language, v1.0.
69. Mi H, Muruganujan A, Casagrande JT, Thomas PD. 2013. Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat Protoc* 8:1551–1566.
70. Mi H, Huang X, Muruganujan A, Tang H, Mills C, Kang D, Thomas PD. 2017. PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. *Nucleic Acids Res* 45:D183–D189.
71. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. 2005. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:15545–15550.

72. Liberzon A, Birger C, Thorvaldsdóttir H, Ghandi M, Mesirov JP, Tamayo P. 2015. The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell Syst* 1:417–425.
73. Araki H, Knapp C, Tsai P, Print C. 2012. GeneSetDB: A comprehensive meta-database, statistical and visualisation framework for gene set analysis. *FEBS Open Bio* 2:76–82.
74. Kanehisa M, Goto S. 2000. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Res* 28:27–30.

FIGURES

Figure 1

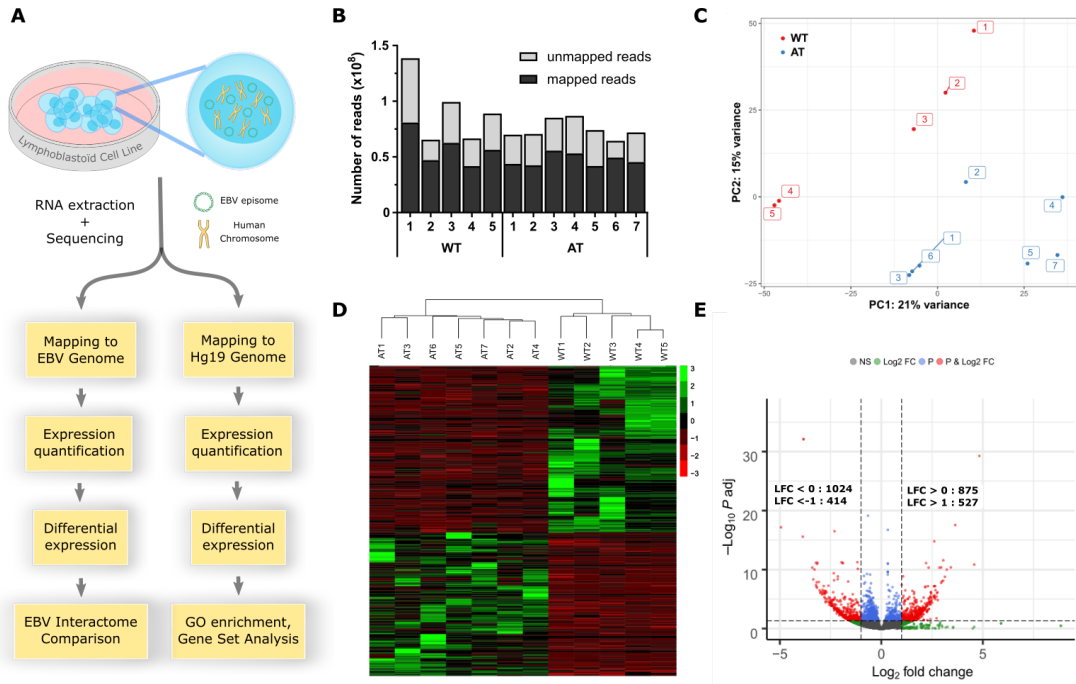


Figure 1: Overview of RNA-seq data generated from lymphoblastoid cell lines derived from 7 AT and 5 unaffected control individuals. (A) Experimental design and bioinformatic data analysis for dual RNA-seq. (B) Result of reads alignment on the human and EBV reference genomes. For each sample, the number of mapped or unmapped read are shown on the y-axis. (C) Principal component analysis (PCA) plot visualizing the similarities between biological replicates and the separation between LCL-WT (red dots) and LCL-AT (blue dots). (D) Hierarchical clustering dendrogram of LCL-WT and LCL-AT normalized gene expression, with expression levels of differentially expressed genes with $|\log_2 \text{FC}| > 1$ showed as a heatmap. Red represent downregulated genes and green represent upregulated genes. (E) Volcano plot displaying \log_2 fold-change against $-\log_{10}(\text{p-adjusted})$. DESeq2 analysis identified 1024 significant downregulated genes and 875 significant upregulated genes among which 414 had a \log_2 fold-change < -1 and 527 had a \log_2 fold-change > 1 .

Figure 2

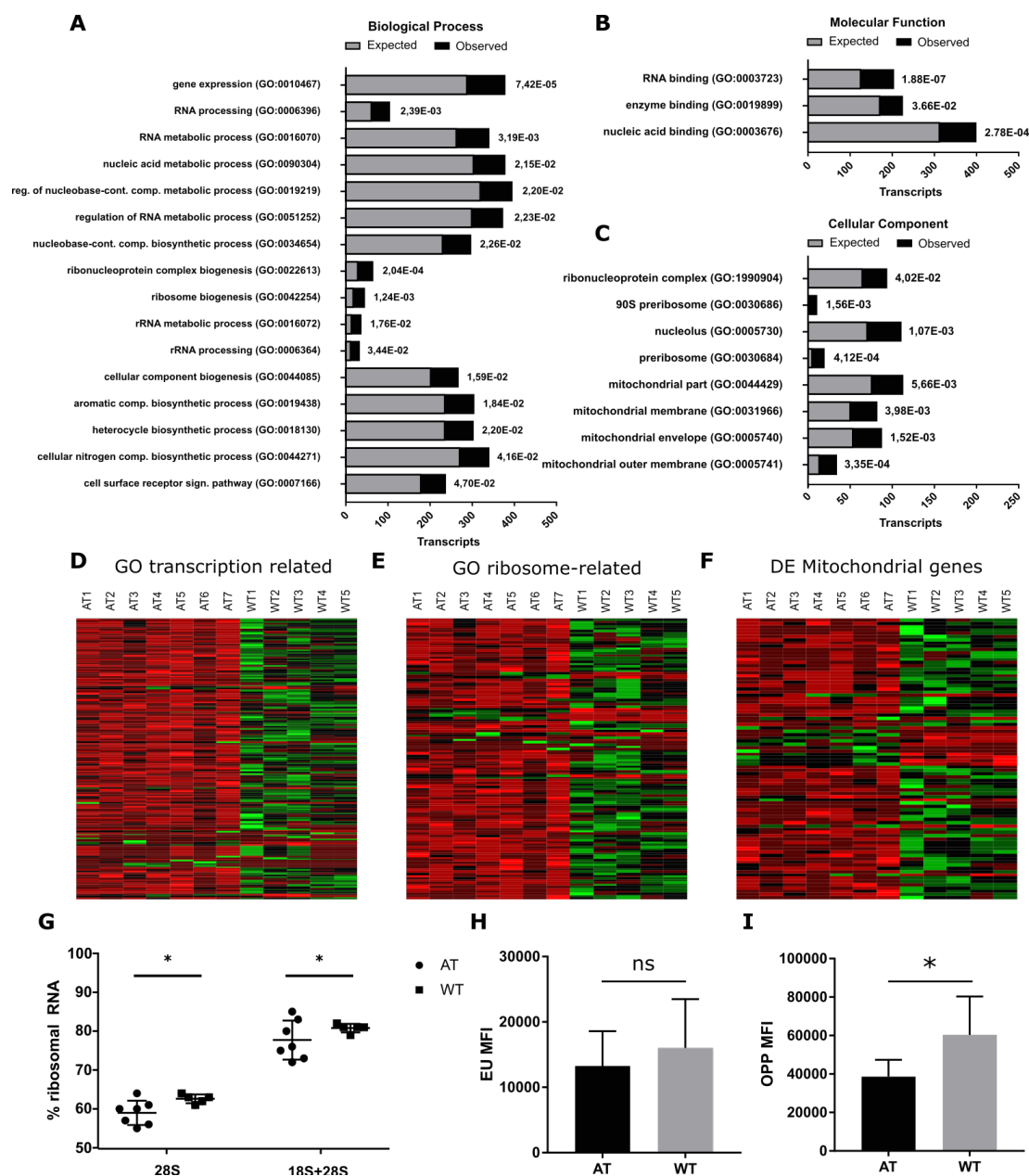


Figure 2: GO analysis of differentially expressed genes and functional exploration. (A-C) The PANTHER statistical over-representation test tool was used to determine over-representation of defined functional GO classes for the 1895 differentially expressed genes: (A) biological process; (B) molecular function; (C) cellular component. Expected and observed frequencies for each GO category are shown by gray and black bars respectively. The number of genes assigned to each category can be determined from the x-axis, and P-value for each GO category is given on the right of each bar. (D-E) Non-redundant genes in over-represented GO categories were regrouped into functional classes and displayed as heatmaps: (D) GO categories related to transcription (GO:0010467; GO:0006396; GO:0016070; GO:0051252; GO:0003723; GO:0090304; GO:0019219; GO:0034654). (E) GO categories related to ribosome (GO:0022613; GO:0042254; GO:0016072; GO:0006364; GO:0030684; GO:0005730; GO:0030686; GO:1990904). (F) All mitochondrial differentially expressed genes, as determined by the BioMart R annotation package are displayed as a heatmap. (G) Expression of rRNA in LCL-AT and LCL-WT shown as a percentage of total RNA expression for 28S and 18S+28S. (H) Analyze of nascent RNA transcription in LCL-AT and LCL-WT 1 hour after 10 μ M 5-ethynyl uridine (EU) incorporation. (I) Analyze of nascent protein synthesis in LCL-AT and LCL-WT 30 minutes after 50 μ M O-Propargyl-puromycin (OPP) incorporation. (H-I) MFI: Mean fluorescence intensity. *: pval <0.05. Data are mean \pm s.d.

Figure 3

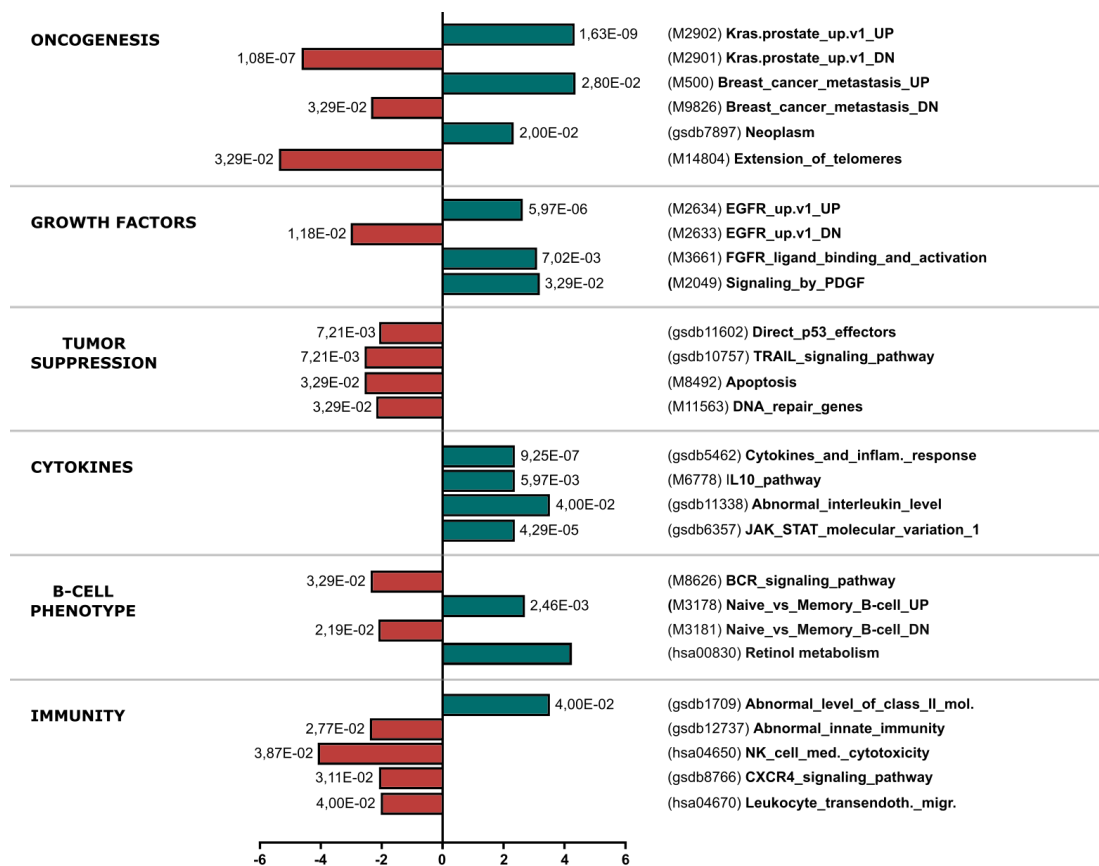


Figure 3: EGSEA analysis of differentially expressed genes. The EGSEA algorithm was used to identify significantly induced or inhibited Gene-Sets from the MSigDB, GSetDB and KEGG databases. Significantly induced (green) or inhibited (red) Gene-Sets of interest are displayed, as given by EGSEA results with $|\text{avg.logfc.dir}| > 2$ and $P.\text{adj} < 0.05$. Interesting Gene Sets were reordered in functional categories : Oncogenesis, Growth Factors receptors, Tumor suppression, Cytokines, B-cell phenotype and Immunity. The avg.logfc.dir value is indicated on the x-axis and the P.adj on the top of each bar.

Figure 4

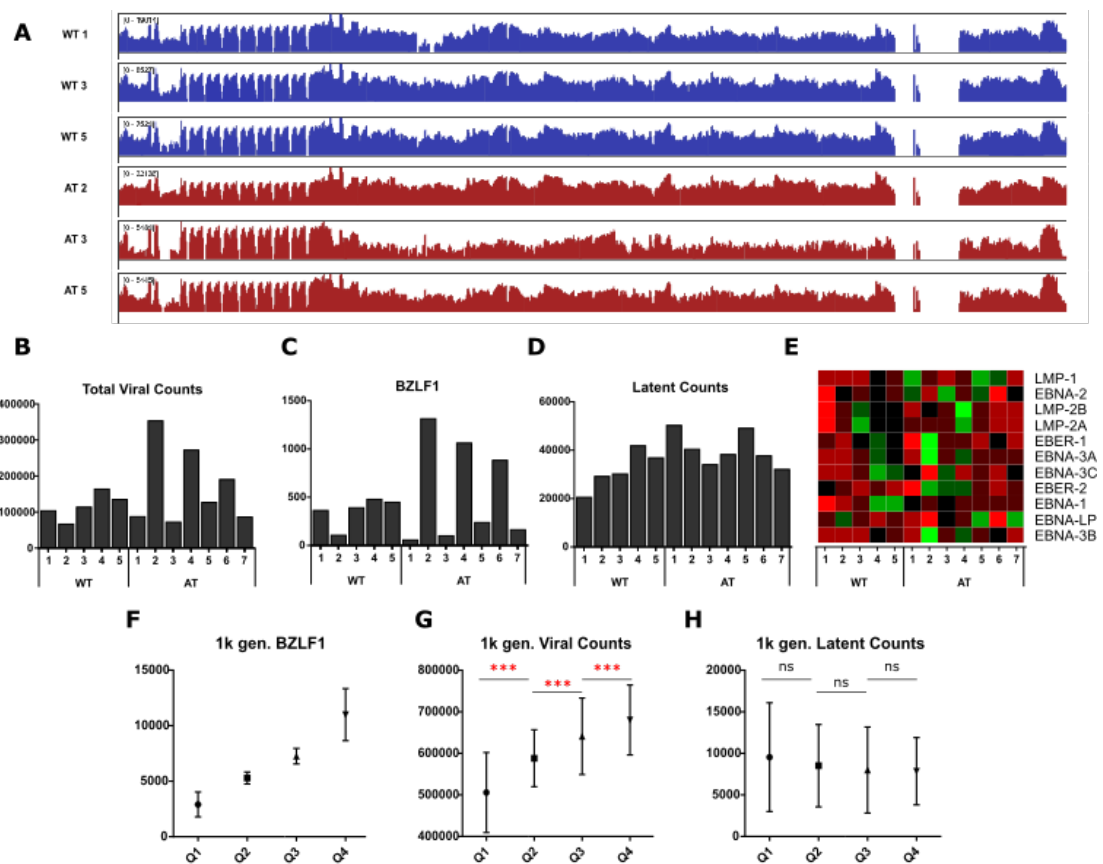


Figure 4: RNA-seq results of the viral genome. (A) Whole genome view of RNA-seq coverage across the EBV genome on representative samples of LCL-WT and LCL-AT. The y-axis shows the number of reads mapping to each location of the EBV genome on a logarithmic scale. (B) Results of reads alignment on the viral genome. The number of normalized reads is indicated on the y-axis. (C) Normalized BZLF1 reads show the expression pattern as total normalized reads. (D) Normalized latent counts were extracted from total viral counts. (E) Heatmap displaying all latent genes in each LCL-WT and LCL-AT. Red represent downregulated genes and green represent upregulated genes. (F-H) analysis of EBV read counts from the 1000 genome project (1k gen.). (F) 476 EBV RNA-seq results were separated in 4 groups regarding the expression of BZLF1 (quantile Q1 to Q4). For each of these quantile, total viral counts (G) and latent counts (H) were determined. ***: pval < 0.001.

Figure 5

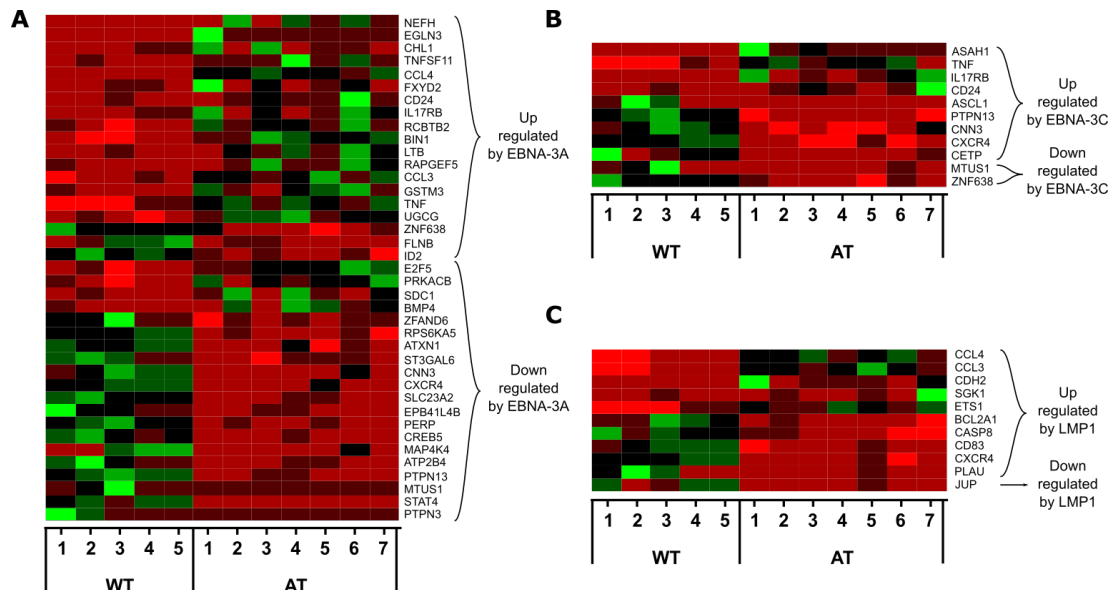
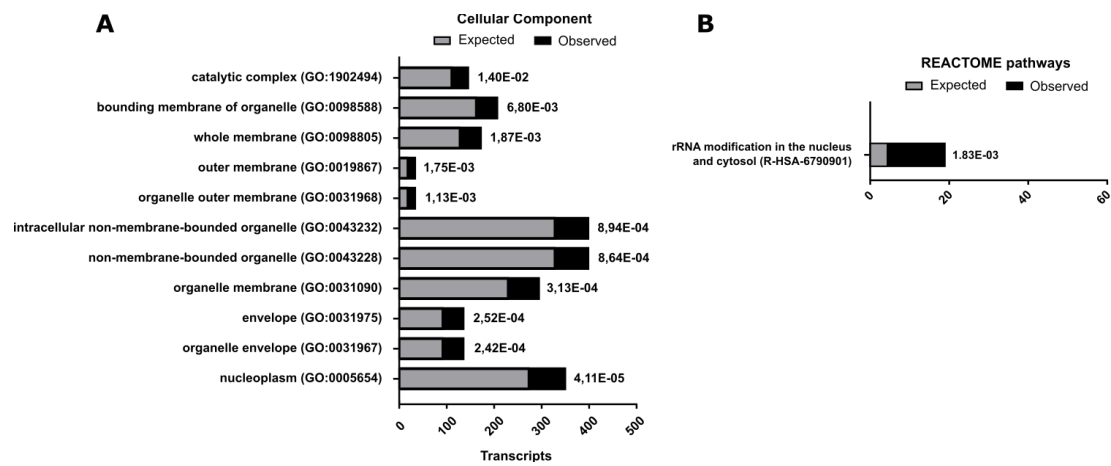


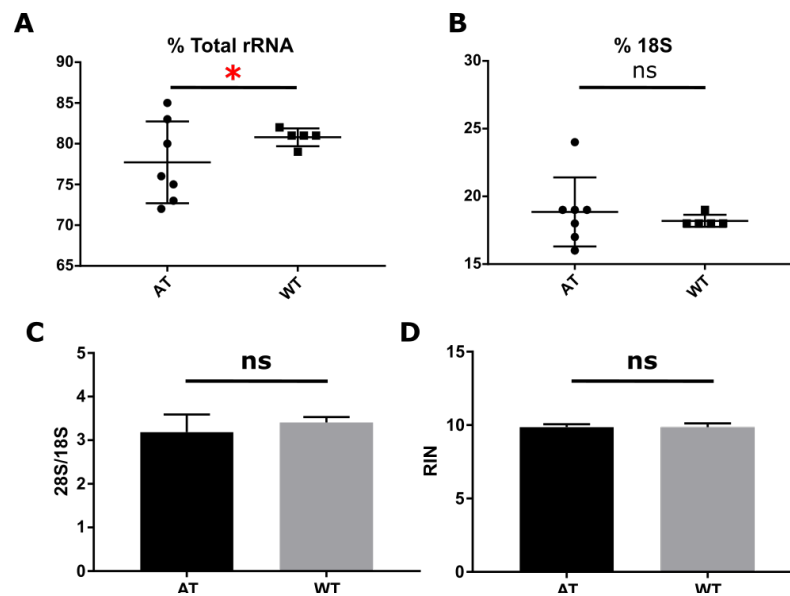
Figure 5: Heatmaps of EBV interactome. (A-C) Heatmaps showing all differentially expressed genes that were described, according to the Polygenicpathway EBV database, as regulated by: (A) EBNA-3A, (B) EBNA-3C, (C) LMP1.

Supplementary figure 1



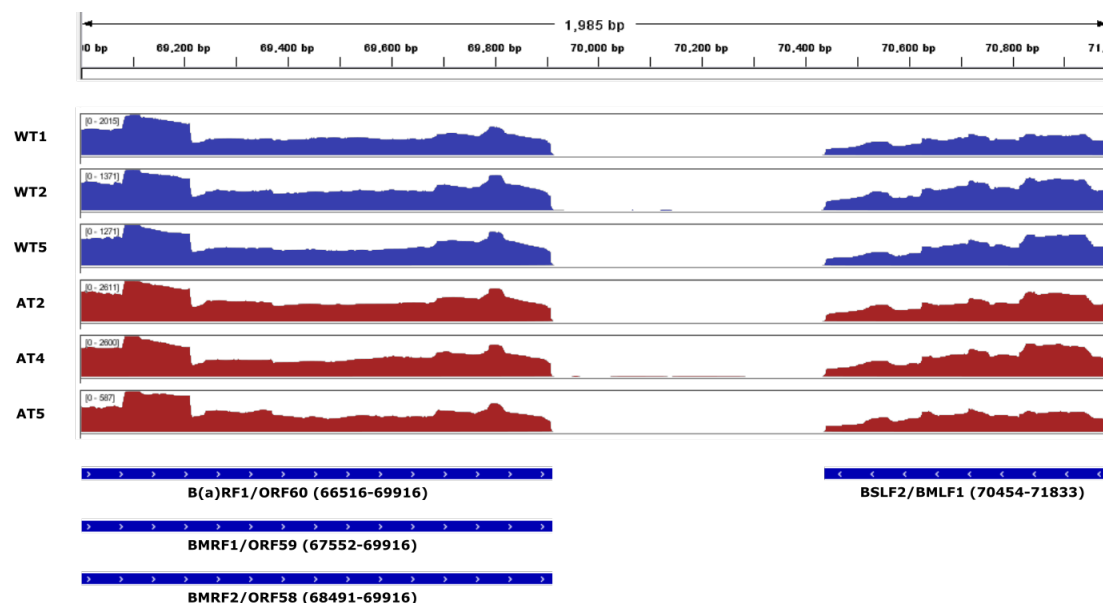
Supplemental Figure 1: GO analysis of differentially expressed genes (A-B) The PANTHER statistical over-representation test tool was used to determine over-representation of defined functional classes for the 1899 differentially expressed genes. (A) These 11 GO categories corresponding to cellular component were judged as too general and non-informative, and were eliminated for better clarity of Figure 2C. (B) Reactome pathways.

Supplementary figure 2



Supplemental Figure 2: Exploration of rRNA content. (A-B) Expression of rRNA in LCL-AT and LCL-WT shown as a percentage of total RNA expression: (A) Total rRNA, (B) 18S rRNA. (C-D) The quality control of RNA degradation was assessed for LCL-AT and LCL-WT using two methods: (C) calculating the 28S/18S ratio, (D) determining the RNA integrity number (RIN).

Supplementary figure 3



Supplemental Figure 3: RNA-seq coverage across an intergenic region of EBV genome. Zoom on a 1985 bp region of EBV genome showing the intergenic region between the end of the EBV genes B(a)RF1/ORF60, BMRF1/ORF59, BMRF2/ORF58 on one side and BZLF2/BMLF1 on the other side. The number in brackets represents the start and the end position of the unique exon of each of these genes, (reference EBV genome V01555.2). The y-axis of each graph shows the number of reads mapping to each location of the EBV genome on a logarithmic scale.

3. Exploration de la fonction mitochondriale

Les résultats du RNA-seq suggèrent un défaut mitochondrial au sein des LCL-AT par rapport aux LCL-WT. La fonction mitochondriale a alors été explorée par la technique SeaHorse qui analyse différents paramètres de la glycolyse et de la respiration mitochondriale par l'emploi de plusieurs drogues (Figure 15).

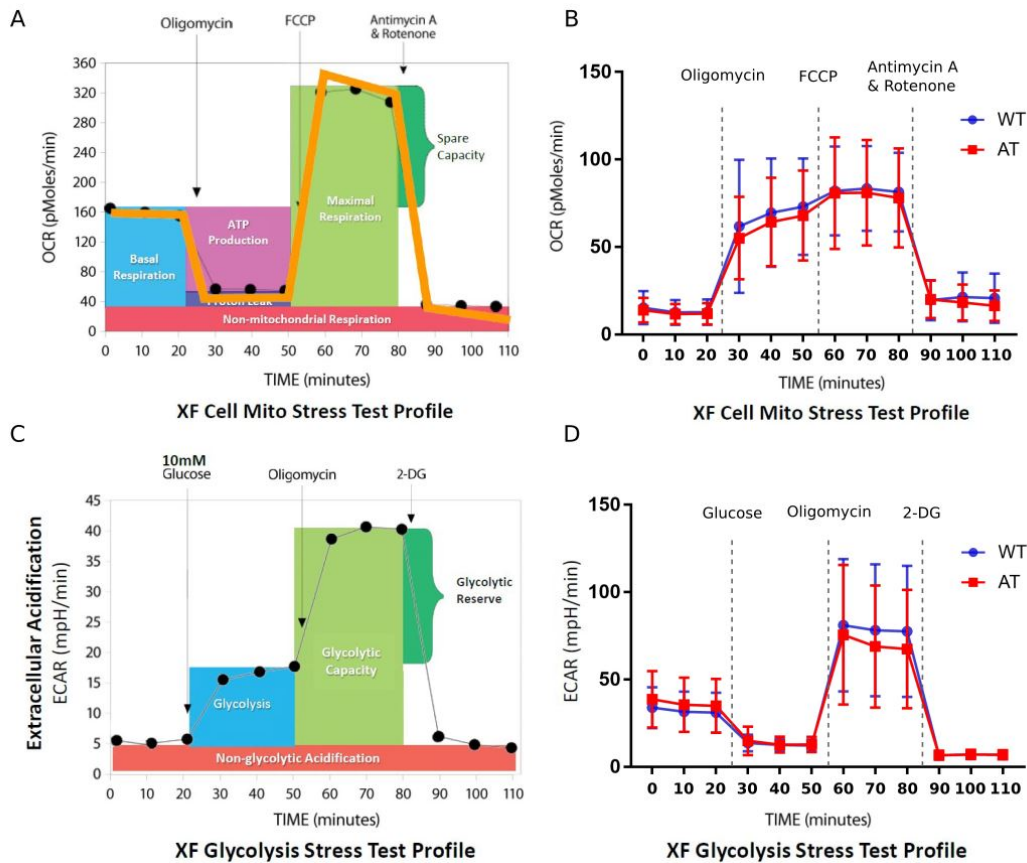


Figure 15 : Etude de la fonction mitochondriale des LCL-AT. ATP (A) Schéma du test de stress mitochondrial mesurant les paramètres de la respiration mitochondriale (OCR : oxygen consumption rate). (B) Le taux de consommation en dioxygène a été mesuré dans les LCL-WT et les LCL-AT en condition basale, puis par addition séquentielle d'oligomycine (0,5 µM), FCCP (1 µM), puis de roténone et d'antimycine A (1 µM), comme indiqué. (C) Schéma du test de stress glycolytique (ECAR : extracellular acidification rate). (D) L'acidification du milieu extracellulaire reflétant la consommation en glucose a été mesurée dans les LCL-WT et les LCL-AT en condition basale, puis par addition séquentielle de glucose 10 mM, d'oligomycine 0,5 µM et de 2-désoxyglucose 100 mM (2-DG). (B-D) Les données sont exprimées en moyenne ± écart-type, n = 6.

Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative pour les différents paramètres de respiration mitochondriale et de la fonction glycolytique des mitochondries entre les LCL-WT et les LCL-AT.

CHAPITRE 3 :

REPONSE A LA STIMULATION DU BCR ET A L'IL21

1. Mise en contexte

Au cours du cycle de vie du virus, le centre germinatif est un environnement particulier où l'expression des gènes de latence virale est progressivement restreinte. En effet, le lymphocyte B infecté est en latence de type III à l'entrée du centre germinatif, exprimant l'ensemble des neuf gènes de latence virale, et se retrouve en latence de type I à sa sortie exprimant seulement EBNA-1, protéine virale permettant de fixer l'épisome viral sur le chromosome cellulaire, ainsi que la ségrégation des épisomes viraux dans les deux cellules filles au cours de la mitose.

Dans cet environnement, l'absence d'ATM dans les lymphocytes B infectés des patients atteints d'AT pourrait conduire à une altération de la restriction de la latence et à une augmentation du risque de lymphomagenèse au sein des centres germinatifs. Cette hypothèse est corroborée par l'observation que les patients atteints d'AT développent principalement des lymphomes de Hodgkin et des lymphomes diffus à grandes cellules B, habituellement décrits comme dérivant des centres germinatifs (D. Canioni et F. Suarez, non publié).

2. Expression des gènes viraux après activation du lymphocyte B

L'étude de l'influence de l'environnement du centre germinatif sur des lymphocytes B infectés par EBV de patients atteints d'AT est compliquée en raison de l'absence de modèles animaux adaptés. Au sein de cet environnement, l'activation du BCR et la stimulation par l'IL-21 ont attiré notre attention en raison de leur lien avec EBV.

L'activation du BCR est bloquée dans les LCL-WT car la protéine virale LMP-2A fixe les kinases Lyn et Syk qui ne peuvent plus permettre la transduction du signal. Cela permet au lymphocyte B infecté par EBV de rester dans un état quiescent le rendant incapable de présenter un antigène (Dykstra et al., 2001). L'activation du BCR a aussi été testée dans les LCL-AT et on ne retrouve pas de différence significative avec les LCL-WT (Speck et al., 2002). Cependant l'expression des gènes de latence de l'EBV n'a pas été explorée dans cette condition.

La stimulation des lymphocytes B par l'IL21 joue un rôle primordial dans la prolifération, l'hypermutation somatique, la transition vers le stade de lymphocyte B mémoire ou de plasmocyte, ainsi que la réponse à l'antigène (Zotos et al., 2010). La stimulation des LCL-WT par l'IL21 est connue pour augmenter l'expression de LMP1 (Konforte et al., 2008), imposant ainsi à la cellule infectée une latence restreinte de type II (Kis et al., 2010).

Nous avons examiné l'influence de l'activation du BCR et de la stimulation par IL21 dans les LCL-AT, en incubant les LCL-AT avec un anticorps Anti-IgM permettant un crosslink du BCR ou avec de l'IL21 humaine recombinante pendant 24 heures, en comparaison avec les LCL-WT. A l'issue de cette période, l'ARN des cellules a été extrait en vue de la réalisation d'une RT-PCR quantitative pour le panel de gènes viraux précédemment défini (Figure 16).

Après activation du BCR, les résultats de RT-PCR quantitative montrent qu'il y a une augmentation de l'expression de LMP-1 dans les LCL-AT par rapport aux LCL-WT. Aucune autre différence significative n'a été trouvée pour les autres gènes étudiés. La comparaison du niveau d'expression de LMP-1 dans les LCL-WT en condition basale et après activation du BCR montre que l'activation du BCR induit une inhibition de l'expression de LMP-1 ($p < 0,001$). Cette inhibition n'est pas présente au sein des LCL-AT. Ces résultats suggèrent qu'au niveau du centre germinatif, l'activation du BCR pourrait induire une restriction de la latence dans les cellules EBV en latence III, restriction qui pourrait avoir lieu dans des conditions moindres chez les patients atteints d'AT.

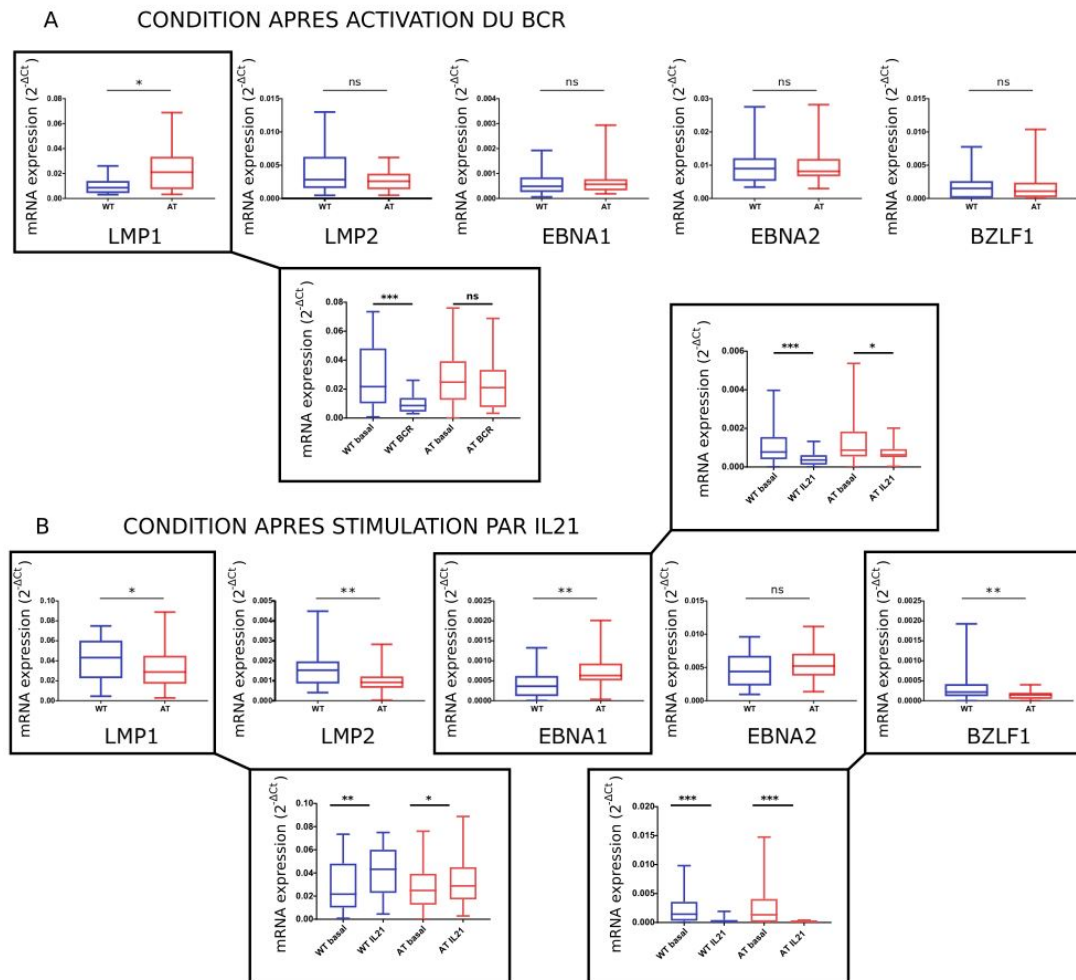


Figure 16 : Influence de l'activation du BCR et de la stimulation par IL21 sur l'expression des gènes viraux. Expression du panel de gènes viraux par le calcul du $2^{-\Delta Ct}$ (en ordonnée) après (A) stimulation du BCR ou (B) après stimulation par l'IL21. Les résultats intéressants dans les encadrés sont reproduits en ajoutant les analyses des conditions sans stimulation pour voir l'effet de la stimulation au sein de chaque lignée. * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$, *** : $p < 0,001$ (test non-paramétrique de Mann-Witney)

Après stimulation par l'IL21, les résultats de RT-PCR quantitative montrent une diminution significative de l'expression de LMP-1, LMP-2, et BZLF-1 au sein des LCL-AT, ainsi qu'une augmentation significative de EBNA-1. Aucune différence significative n'est observée pour EBNA-2. La comparaison du niveau de LMP-1 aux conditions sans stimulation montre que LMP-1 est significativement induit à la fois dans les LCL-WT ($p < 0,01$) et dans les LCL-AT ($p < 0,05$), avec cependant une induction plus élevée au sein des LCL-WT ($p < 0,05$).

EBNA-1 est significativement inhibé à la fois dans les LCL-WT ($p < 0,001$) et les LCL-AT ($p < 0,05$), avec une inhibition plus élevée au sein des LCL-WT ($p < 0,01$). Ces résultats suggèrent un effet de la stimulation par l'IL21 similaire entre les lignées LCL-WT et LCL-AT mais plus important au sein des lignées LCL-WT.

Enfin BZLF1 est significativement inhibé à la fois dans les LCL-WT ($p < 0,001$) et les LCL-AT ($p < 0,001$) avec une inhibition plus élevée au sein des LCL-AT ($p < 0,01$). Ces résultats pourraient suggérer que l'induction du cycle lytique se ferait dans une moindre proportion au sein des cellules infectées par EBV et stimulées par l'IL21, chez les patients atteints d'AT. La baisse du niveau de BZLF-1 confirme l'impact de l'IL21 ([Konforte et Paige 2009](#)).

Les résultats concernant l'activation du BCR et la stimulation par l'IL21 étant particulièrement intéressants, il a été décidé d'explorer ces conditions en RNA-seq.

3. BCR/IL21 en RNA-seq

Pour explorer l'influence de l'activation du BCR et de la stimulation par IL21 sur l'expression des gènes de latence de l'EBV au sein des LCL-AT, nous avons analysé 3 LCL-WT et 3 LCL-AT par RNA-seq en condition basale, après activation du BCR ou après stimulation par IL21. Cette analyse est réalisée de manière concomitante sur le génome cellulaire et le génome viral.

a. BCR

L'analyse des conditions avec et sans stimulation du BCR a montré 3 gènes différentiellement exprimés dans les LCL-AT et 7 dans les LCL-WT. Ces gènes sont pour la plupart des pseudogènes ou des gènes codant des protéines non connues. Étant donné le caractère peu vraisemblable du faible nombre de gènes différentiellement exprimés et la contradiction avec nos résultats de RT-PCR quantitatives, il s'agit d'un artefact.

L'explication la plus vraisemblable est celle d'un problème technique sans que l'étape à laquelle ce problème ait eu lieu ne puisse être discerné. La grande concentration d'anti-IgM nécessaire à l'activation du BCR (10¹⁰g/mL) fait qu'un tube d'anticorps complet est utilisé pour chaque comparaison. Le tube d'anti-IgM utilisé pour le RNA-seq n'a pas pu être testé pour confirmer la reproductibilité des résultats de RT-PCR quantitative.

b. IL21

La comparaison des LCL-WT stimulés par IL21 par rapport aux LCL-WT sans stimulation (ci-après condition A) retrouve 1651 gènes différentiellement exprimés (p ajustée <0,05), dont 922 sont surexprimés et 729 sont sous-exprimés. Parmi ces gènes, 957 présentent un | log₂ fold-change | > 1. La comparaison des LCL-AT stimulés par IL21 par rapport aux LCL-WT sans stimulation (ci-après condition B) retrouve 386 gènes différentiellement exprimés (p ajustée <0,05), dont 204 sont surexprimés et 182 sont sous-exprimés. Parmi ces gènes, 352 présentent un | log₂ fold-change | > 1. (Figure 17A). Le nombre de gènes DE après stimulation par l'IL21 est largement supérieur au sein des LCL-WT qu'au sein des LCL-AT. Ces résultats suggèrent que la stimulation par l'IL21 des LCL-AT module moins de gènes que la stimulation des LCL-WT.

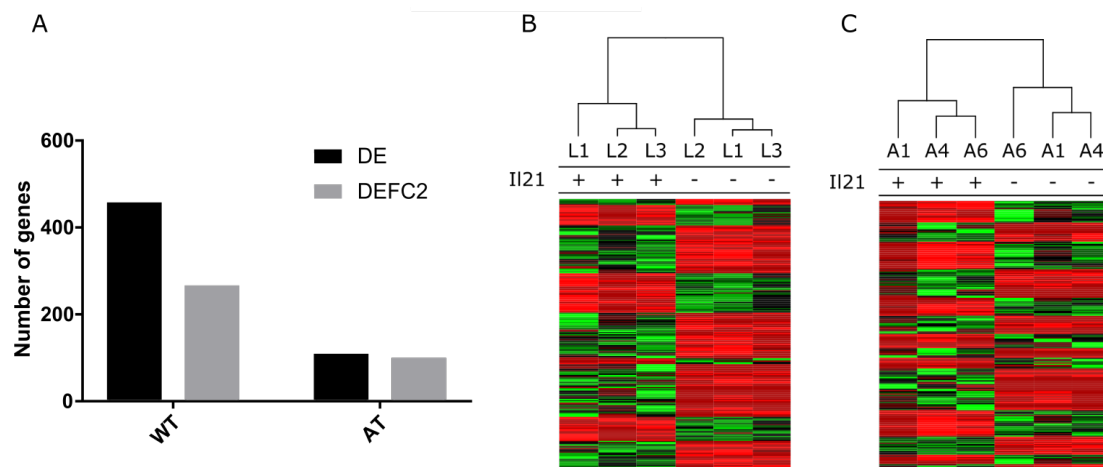


Figure 17 : Analyse des résultats du RNA seq après stimulation par IL21. (A) Moyenne du nombre de gènes DE et du nombre de gènes DEFC2 avec un $|\log_2 \text{fold-change}| > 1$ sur les 3 LCL-WT et les 3 LCL-AT après stimulation par IL21. (B-C) Heatmap présentant les gènes DE entre la condition basale et la condition avec stimulation par IL21 (B) pour les lignées LCL-WT et (C) pour les lignées LCL-AT. Le dendrogramme présente la classification non supervisée des lignées analysées. +/- : condition avec stimulation par IL21/ basale respectivement.

Une heatmap des gènes DE des conditions A et B a été réalisée et a un aspect différent entre ces conditions, confirmant la suggestion d'un effet différent de l'IL21 sur les LCL-WT et les LCL-AT (Figure 17B-C).

Une analyse de surreprésentation des Gene-Ontology des gènes différenciellement exprimés est réalisée à l'aide de l'outil « over-representation tool » du système de classification PANTHER. Les résultats les plus importants de cette analyse sont présentés dans la figure 18.

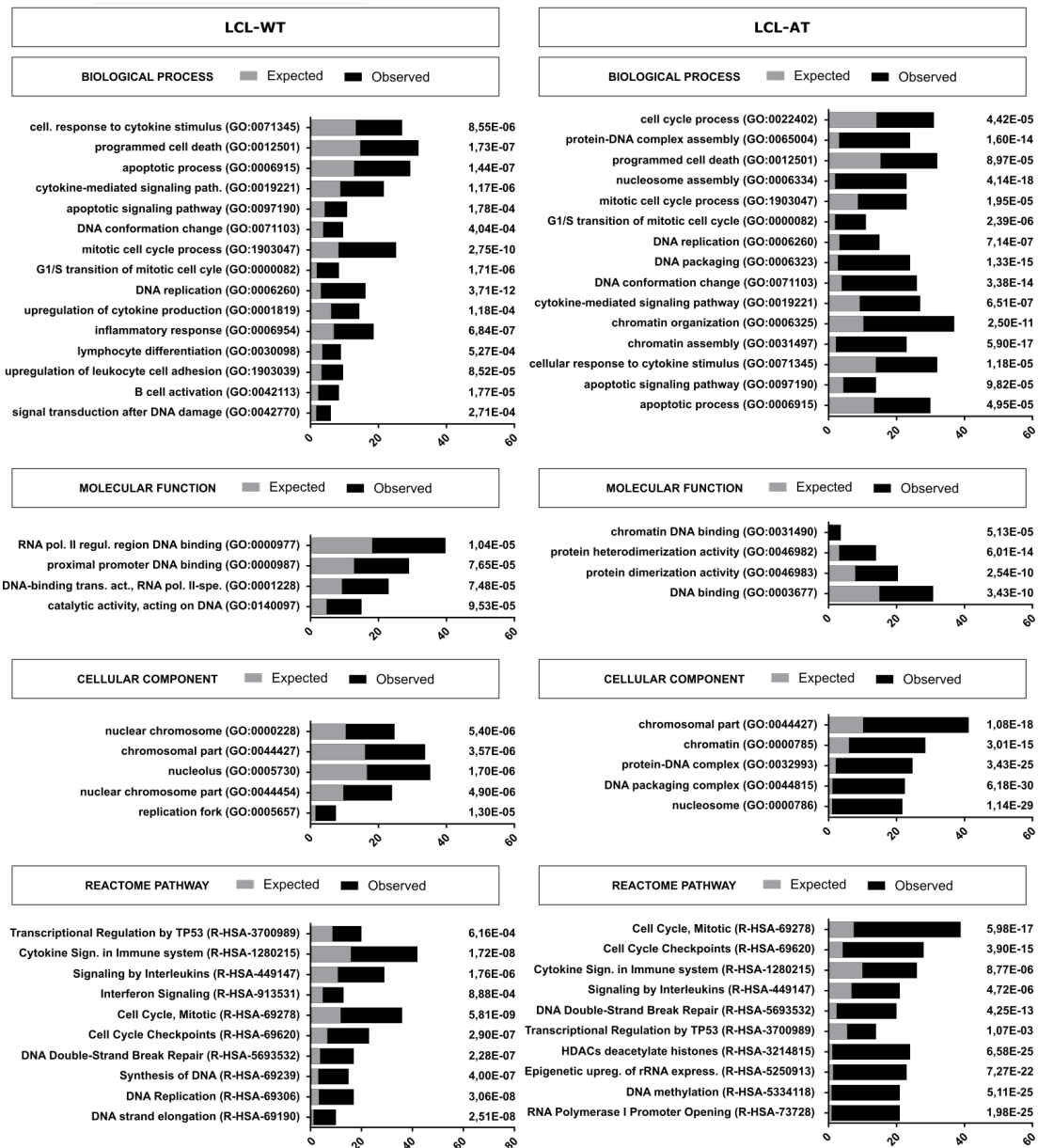


Figure 18 : Analyse par GO des gènes DE après stimulation par IL21. L'outil « over-representation tool » du système de classification PANTHER a été utilisé pour déterminer la surreprésentation de classes GO fonctionnelles définies pour les gènes DE pour les processus biologiques (Biological Process), fonctions moléculaires (Molecular functions), composants cellulaires (Cellular functions), ainsi que les voies de signalisation Reactome (Reactome Pathways). Les fréquences attendues (Expected) et observées (Observed) pour chaque catégorie GO et Reactome Pathway sont respectivement indiquées par des barres grises et noires. Le nombre de gènes attribués à chaque catégorie peut être déterminé à partir de l'axe des abscisses et la p pour chaque catégorie est indiquée à droite de chaque barre.

Les différentes Gene-Ontology ainsi que les Reactome Pathways obtenues appartiennent à 4 grandes catégories que sont le cycle cellulaire, la régulation de l'apoptose, l'homéostasie et épigénétique de la chromatine, et la réponse cytokinique. L'IL21 est une cytokine qui induit la prolifération et la différenciation des lymphocytes B dans le centre germinatif (Zotos et al., 2010), ainsi que l'apoptose des lymphocytes B activés par dérégulation de BCL-2 (Mehta et al., 2003). Nos résultats montrent que ces processus sont conservés dans les LCL, à la fois les LCL-WT et les LCL-AT. Cependant les Gene-Ontology et les Reactome Pathways des LCL-WT semblent être principalement liés à la réponse cytokinique alors que l'homéostasie et l'épigénétique de la chromatine priment dans les LCL-AT.

Une analyse par EGSEA a été réalisée pour approfondir l'analyse des différents effets de l'IL21 sur les LCL-WT et LCL-AT. Cet outil combine 12 algorithmes différents et explore les bases de données MSigDB, GeneSetDB et KEGG, comportant plus de 25 000 ensembles de gènes (Gene-Sets). EGSEA compare la liste des gènes DE à chaque Gene-Set, et détermine si la liste des gènes DE est significativement enrichie ou appauvrie au sein de chaque Gene-Sets en présentant une p-value corrigée et un fold-change. Dans un premier temps, les Gene-Sets connus pour être induits par l'IL21 ont été isolés manuellement afin d'explorer l'effet de l'IL21 sur ces lignées (Figure 19).

EGSEA Gene-Sets	LCL-WT		LCL-AT	
	p.value	FC	p.value	FC
Upregulated by STAT1 transcription factor	4,16E-06	1,45	4,77E-01	1,21
Upregulated by STAT3 transcription factor	2,60E-05	1,35	3,54E-02	1,17
Upregulated by STAT5A transcription factor	2,18E-02	1,44	3,39E-02	1,54
Upregulated by STAT5B transcription factor	1,87E-02	1,48	2,56E-02	1,59
Th17 cell differentiation	3,23E-03	1,07	3,17E-01	0,93
Inflammatory response	9,01E-09	1,22	3,34E-06	1,15
Regulation of IFNG signaling	5,38E-04	1,25	6,30E-03	1,08
Positive regulation of leukocyte proliferation	4,34E-03	1,19	4,16E-02	1,01
Apoptosis	1,09E-02	1,01	5,84E-02	0,84
Upregulated in memory B-cells (vs Naive B-cells)	2,70E-06	1,13	3,35E-05	1,35
Upregulated in Plasma cells (vs Naive B-cells)	8,43E-01	0,75	7,48E-02	0,79

Figure 19 : Analyse EGSEA des Gene-Sets associés à l'activation par l'IL21. Les Genes-Sets associés à la stimulation par IL21 ont été extraits des résultats de l'algorithme EGSEA appliqués au LCL-WT et aux LCL-AT après stimulation par l'IL21.

L'IL21 induit une phosphorylation de STAT-1, STAT-3 et STAT-5 mais son activité dépend principalement des STAT-1 et STAT-3 (Avery et al., 2010). Les Gene-Sets correspondant à l'activation des STAT-1, STAT-3 et STAT-5 sont bien transactivés dans les LCL-WT, ainsi que les autres Gene-Sets connus pour être transactivés par l'IL21, suggérant une activation normale de la voie IL21 dans les LCL-WT. Dans les LCL-AT, on observe bien une transactivation des Gene-Sets correspondant à l'activation des STAT-3 et STAT-5 mais cette transactivation n'est pas significative pour STAT-1. On observe également une absence de transactivation significative des Gene-Sets correspondant à la différenciation en Th17 et à l'apoptose. Les Gene-Sets correspondant aux gènes transactivés dans les plasmocytes ne sont pas transactivés dans les LCL-WT ni dans les LCL-AT. Il est intéressant de noter que les p-value des Gene-Sets décrits sont en général moins significatifs dans les LCL-AT en comparaison avec les LCL-WT, suggérant que l'IL21 a moins d'effet sur les LCL-AT.

Dans un second temps, l'ensemble des Gene-Sets significativement enrichis ou appauvris ($p < 0,05$) ont été isolés pour les conditions A et B. Compte tenu de l'immense quantité de données obtenues, nous n'avons gardé que les Gene-Sets dont le log2 fold-change était supérieur à 1 en valeur absolue (Figure 20).

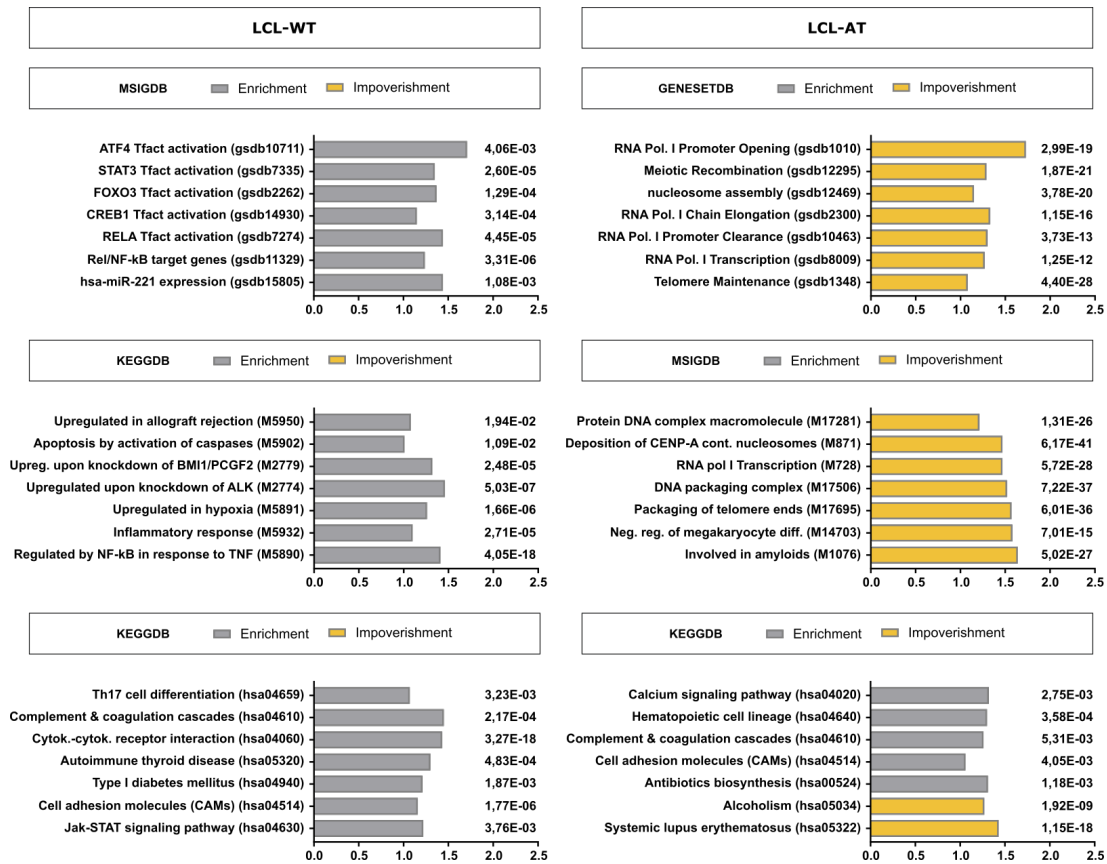


Figure 20 : Analyse EGSEA des gènes DE après stimulation par l'IL21. L'algorithme EGSEA a été utilisé pour identifier les Gene-Sets significativement enrichis (gris) ou appauvris (jaune) à partir des bases de données MSIGDB, GSetDB et KEGG. Les Genes-Sets intéressants sont présentés avec la valeur du $|\log_2 \text{fold-change}|$ indiquée sur l'axe des abscisses et la p ajustée indiquée à la fin de chaque barre.

On observe que les résultats GS significativement enrichis ou appauvris concernent en grande partie la réponse inflammatoire dans les LCL-WT et l'homéostasie et épigénétique de la chromatine dans les LCL-AT, ce qui confirme les résultats obtenus par l'analyse des GO. Cependant, très peu de GS sont significativement appauvris dans les LCL-WT alors qu'une grande partie l'est dans les LCL-AT. Ces GS concernent surtout l'homéostasie de la chromatine et l'ARN polymérase I. Cela pourrait suggérer la présence d'un défaut de synthèse de l'ARN ribosomal au sein des LCL-AT.

Les reads viraux ont été extraits des reads totaux après normalisation sur la taille de la bibliothèque de chaque échantillon, puis visualisés par le logiciel IGV (Figure 21A) qui ne retrouve pas de régions spécifiquement enrichies ou appauvries dans les LCL-AT.

La quantité de reads viraux totaux, de cycle lytique et de cycle latent ainsi que l'expression de BZLF1 et de LMP-1 a été évaluée pour chacune des 6 lignées après stimulation par IL21 et comparée à la quantité de reads viraux correspondante en condition basale (Figure 21B-F). La tendance d'expression de BZLF1 suit le même modèle que celui des gènes de cycle lytique, mais n'influe pas l'expression des gènes de latence comme démontré dans le chapitre précédent.

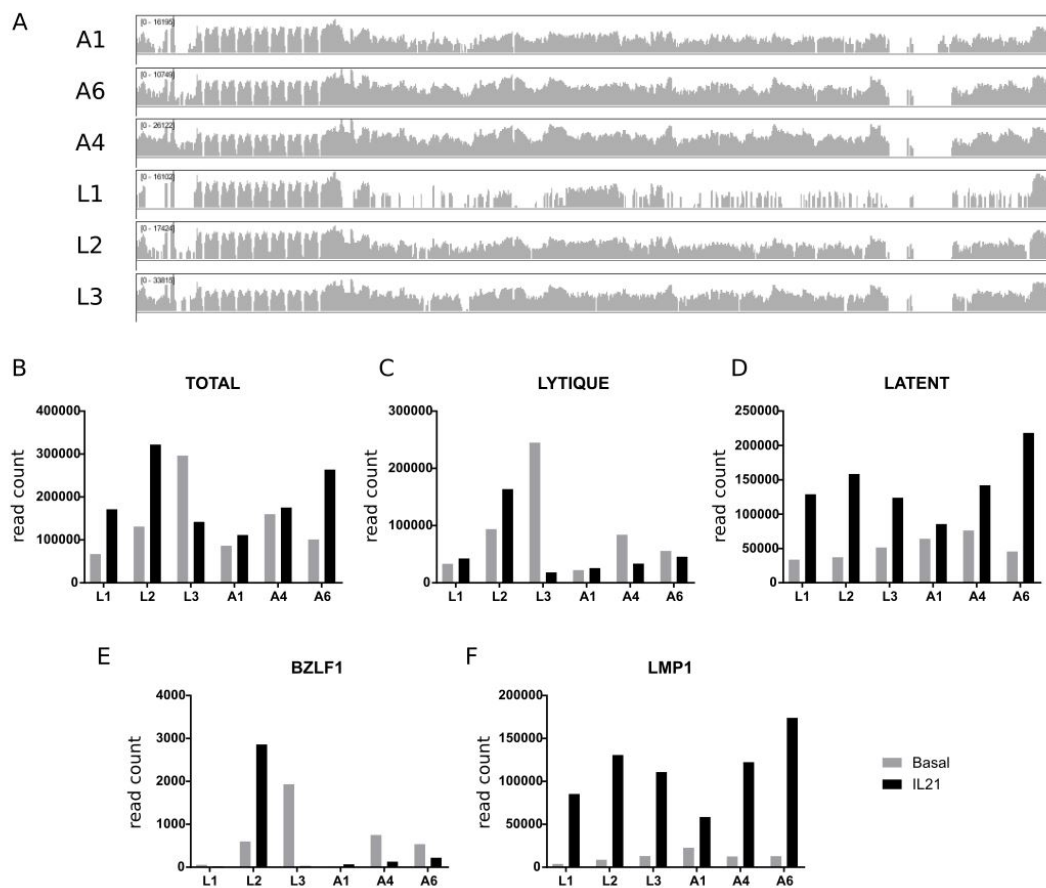


Figure 21 : Visualisation du génome viral. (A) Le génome viral des 6 lignées analysées en RNA-seq après stimulation par l'IL21 a été visualisé à l'aide du logiciel IGV. L'ordonnée représente la quantité de reads viraux selon la position sur le génome viral sur une échelle logarithmique. (B-F) Pour chacune des 6 lignées étudiées après stimulation par l'IL21, la quantité de reads viraux totaux (B), de cycle lytique (C), de cycle latent (D), de BZLF1 (E) et de LMP1 (F) a été déterminée et comparée à la condition basale correspondante.

On observe que la stimulation par IL21 induit des gènes de latence virale à la fois dans les LCL-WT que dans les LCL-AT (Figure 21D). Cette induction de gènes de latence concerne principalement le gène LMP-1 (Figure 21F).

La comparaison des gènes de latence au sein des lignées LCL-WT et LCL-AT entre les conditions basales et après stimulation par IL21 est présentée dans la figure 22. On observe que l'IL21 induit LMP-1 à la fois dans les LCL-WT et dans les LCL-AT avec une tendance supérieure dans les LCL-WT (Figure 22A). Au sein des LCL-AT, on observe également une diminution de EBNA-1, de LMP-2A et LMP-2B et de EBER-2.

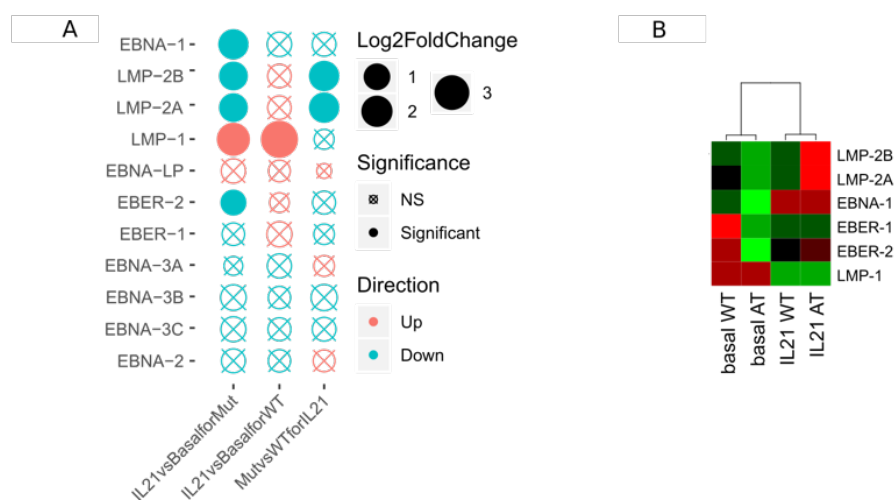


Figure 22 : Expression des gènes de latence de l'EBV après stimulation par l'IL21. L'expression de chacun des gènes de latence a été évaluée après normalisation des reads viraux sur la taille de la bibliothèque entre la condition basale et la condition après stimulation par l'IL21, pour les LCL-WT et les LCL-AT. (A) Résumé des résultats de l'analyse différentielle des gènes de latence au sein des LCL-AT comparés aux LCL-WT. (B) Heatmap des différents gènes de latence apparaissant au moins une fois comme DE au sein des LCL-WT ou des LCL-AT.

Ces données confirment les résultats obtenus par RT-PCR quantitative pour les gènes LMP-1, LMP-2, EBNA-1 et EBNA-2. Une heatmap a été réalisée pour apprécier le niveau d'expression des gènes de latence différemment exprimés dans les LCL-AT, pour les lignées LCL-WT et LCL-AT, et dans les conditions basales et après stimulation par l'IL21 (Figure 22B).

4. Exploration de la voie de l'IL21

Les résultats de RNA-seq suggèrent que les lignées LCL-AT ont un défaut de réponse à l'IL21 par rapport aux LCL-WT. Ce défaut pourrait venir d'une quantité de récepteur à l'IL21 moins importante dans les LCL-AT ou d'un défaut de la voie de signalisation en aval du récepteur.

1. Expression du récepteur à l'IL21

Le récepteur à l'IL21 (IL21R) a été quantifié dans les lignées LCL-WT et LCL-AT par cytométrie en flux (Figure 23). Aucune différence significative n'a été retrouvée, ce qui implique que le défaut de réponse à l'IL21 se situe en aval du récepteur.

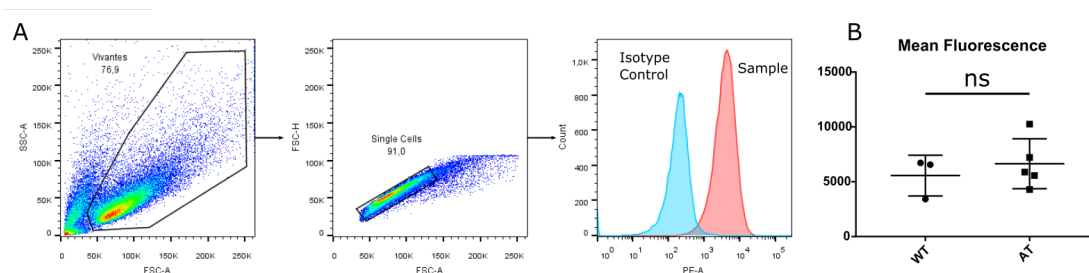


Figure 23 : Expression du récepteur à l'IL21 dans les LCL-AT. (A) L'expression du récepteur à l'IL21 (IL21R) a été quantifiée en cytométrie en flux dans 3 LCL-WT et 5 LCL-AT. (B) Analyse statistique des différences de moyennes de fluorescence pour les lignées LCL-WT et LCL-AT (test non-paramétrique de Mann-Witney).

2. Analyse du phosphokinome

Pour explorer en détail la voie de signalisation de l'IL21 en aval du récepteur, un phosphokinome a été réalisé sur une lignée LCL-WT et LCL-AT avant et après stimulation par l'IL21 (Figure 24). Le phosphokinome permet l'analyse simultanée de la phosphorylation de plus de 40 kinases, impliquées dans les voies ubiquitaires d'activations cellulaires.

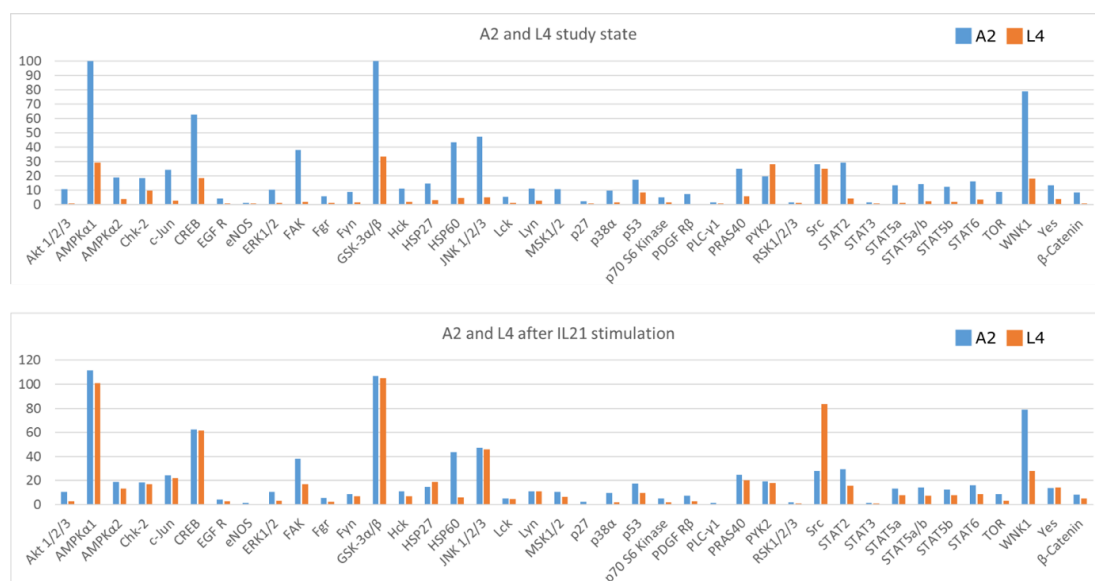


Figure 24 : Analyse du phosphokinome en condition basale et après stimulation par IL21. Un phosphokinome explorant la phosphorylation de plus de 40 kinases impliquées dans les voies ubiquitaires d'activations cellulaires a été réalisé sur une lignée LCL-WT (AN4 correspondant à L4) et une lignée LCL-AT (A2) en condition basale et après activation par l'IL21.

On observe que les kinases impliquées dans la voie de l'IL21, comme STAT-3 et STAT-5, et d'autres kinases impliquées dans de multiples voies de signalisation (Akt) sont activées de manière basale au sein de la lignée LCL-AT, mais pas au sein de la lignée LCL-WT. Cela pourrait expliquer pourquoi les lignées AT ont une absence de réponse à l'IL21 : les voies impliquées sont déjà en partie activées. L'activation de ces lignées par l'IL21 augmente la phosphorylation de la plupart des kinases avec un taux de phosphorylation comparable entre la lignée LCL-WT et LCL-AT pour la majorité des kinases étudiées.

DISCUSSION

1. Discussion des résultats

a. Introduction

Les patients atteints d'AT ont une incidence élevée de EBV-LPD, qui ne semble pas seulement s'expliquer par l'immunodéficience induite par cette maladie. Nous faisons l'hypothèse qu'ATM intervient dans le contrôle de la latence de l'EBV en situation physiologique, et que la levée de ce contrôle chez les patients atteints d'AT pourrait contribuer à déréguler la latence de l'EBV et à favoriser l'oncogenèse induite par ce virus. Cette hypothèse a été testée, au cours de cette thèse, sur des lignées lymphoblastoïdes dérivées de patients atteints d'AT et de donneurs sains.

b. Prolifération et traduction

L'analyse par RNA-seq de ces lignées montre que les LCL-AT ont un transcriptome compatible avec une oncogenèse accrue, suggérant une induction d'oncogènes et une inhibition de suppresseurs de tumeurs par rapport aux LCL-WT. Ce phénotype oncogénique a également été montré dans des LCL-AT par analyse transcriptomique (microarrays), ([Zhang et al., 2013](#)) et dans des cellules épithéliales mammaires issues de patients atteints d'AT par analyse RNA-seq ([Hesse et al., 2013](#)).

Les lignées LCL-AT prolifèrent en moyenne plus que les LCL-WT, avec une grande variabilité intragroupe, certaines LCL-WT proliférant plus que certaines LCL-AT. Un phosphokinome réalisé entre 2 lignées LCL-WT et LCL-AT ayant une grande différence de prolifération montre que de façon basale, les LCL-AT expriment plus de protéines phosphorylées impliquées dans la prolifération cellulaire que les lignées LCL-WT. ATM a un rôle de gardien du génome, de ce fait elle est à la fois un proto-oncogène et un suppresseur de tumeur selon le contexte cellulaire. Lorsque des lignées tumorales sont déficientes en p53, l'inhibition d'ATM sensibilise considérablement les cellules à la mortalité induite par la chimiothérapie ([Jiang et al., 2009](#)). En revanche, en présence de p53, l'inhibition d'ATM protège les cellules contre la mortalité induite par la chimiothérapie ([Jiang et al., 2009](#)), ou la radiothérapie ([Shigetla et al., 1999](#)).

De même, l'inhibition d'ATM concomitante avec l'activation de Myc augmente la prolifération et diminue l'apoptose (Maclean et al., 2007). Lors de la génération de lignées lymphoblastoïdes, l'inhibition d'ATM permet d'augmenter la proportion de cellules en prolifération de 30% (Nikitin et al., 2010). Les fibroblastes issus de patients atteints d'AT semblent toutefois avoir un temps de doublement plus lent que les fibroblastes issus de donneurs sains (Elmore et Swift, 1976). Ces résultats sont donc à prendre en considération uniquement dans le contexte des LCL. Les LCL peuvent entraîner la survenue de lymphomes chez des souris immunodéprimées (Giovanela et al., 1979). Il serait intéressant d'injecter des LCL-AT à des souris immunodéprimées et de comparer le phénotype des lymphomes induits avec ceux survenant chez des souris immunodéprimées injectées avec des LCL-WT.

L'analyse du RNA-seq met en exergue un défaut de transcription et de traduction dans les LCL-AT, dont seul le défaut de traduction a été démontré au niveau biologique. La quantité d'ARN ribosomale est également significativement diminuée dans les LCL-AT. ATM a déjà été décrite comme ayant une activité importante d'initiation de la traduction en réponse à l'insuline (Yang et Kastan, 2000). ATM régule également l'initiation de la traduction des cellules dendritiques (So et Ouchi, 2014). En cas de CDB, ATM induit la transcription et la traduction de gènes cibles (Díaz-Muñoz et al., 2017) et inhibe la dégradation protéasomale d'autres gènes (von Stechow et al., 2015). ATM induit de même la traduction par inhibition de mTOR (Alexander et al., 2010 ; Mayer et al., 2014). L'inhibition d'ATM réduit également la transcription nucléolaire basale des neurones corticaux de rats en culture (Smith and Hetman, 2011). Ceci suggère qu'ATM est impliquée dans l'homéostasie de la traduction et de la transcription, notamment de l'ADNr. D'autres tests biologiques sont nécessaires pour explorer la fonction de transcription dans notre modèle, dont la tendance va également en faveur d'une diminution.

D'un côté, les LCL-AT ont un phénotype oncogénique, prolifèrent plus rapidement que les LCL-WT avec un phosphokinome en faveur d'une activation supérieure des protéines impliquées dans le cycle cellulaire ; et de l'autre côté, les LCL-AT ont un RNA-seq montrant un défaut des voies de traduction, ont une quantité de rRNA plus faible, et une cinétique de synthèse de protéines plus faible que dans les LCL-WT. Ces deux observations semblent incompatibles : comment font les cellules des LCL-AT pour proliférer plus rapidement que celles des LCL-WT tout en ayant une cinétique de traduction diminuée ?

Une hypothèse pour expliquer ce paradoxe serait que le catabolisme des protéines pourrait être très lent dans les LCL-AT, ce qui maintiendrait un stock de protéines équivalant aux LCL-WT, tout en ayant une cinétique de traduction diminuée. Cette hypothèse pourrait être explorée par la mesure des demi-vies par une technique de pulse-chase pour vérifier la présence d'un défaut de catabolisme dans les LCL-AT.

c. Latence de l'EBV

Le phénotype oncogénique des LCL-AT pourrait être expliqué par l'absence d'ATM, mais aussi par la dérégulation des gènes de latence de l'EBV, qui ont pour la plupart une activité oncogénique (Kang et Kieff, 2015). Après analyse par RT-PCR quantitative des LCL-WT et LCL-AT, on retrouve pour seule différence une diminution de LMP-2 dans les LCL-AT, sans toutefois avoir exploré les gènes EBNA-3 et EBNA-LP. L'analyse RNA-seq en condition basale retrouve une augmentation de LMP-1 dans les LCL-AT. Ces données concernant LMP-1 et LMP-2 sont à première vue inconsistantes : LMP-1 est significativement augmenté seulement dans le RNA-seq et LMP-2 est significativement diminué seulement en RT-PCR quantitative. En réalité, les tendances dans ces deux conditions vont toutes en faveur d'une augmentation de LMP-1 et une diminution de LMP-2 avec un degré de significativité variable. La diminution significative de la transcription de LMP-2 dans les LCL-AT ne semble pas avoir d'impact sur la protéine LMP-2A, exprimée de la même façon dans les LCL-WT et LCL-AT. La protéine LMP-2B pourrait être impliquée mais elle est habituellement beaucoup moins exprimée que LMP-2A et nous ne disposons pas d'anticorps anti-LMP-2B. Cette différence pourrait également être expliquée par une augmentation de la demi-vie de l'ARN de LMP-2 ou de la cinétique de traduction.

La transcription des autres gènes de latence ne semble pas différente entre les LCL-AT et les LCL-WT. Une comparaison des résultats de RNA-seq avec la base de données EBV PolygenicPathway montre toutefois que les gènes induits par EBNA-3A le sont aussi dans les LCL-AT et les gènes inhibés par EBNA-3A le sont aussi dans les LCL-AT, ce qui suggère une activité augmentée de EBNA-3A dans les cellules. Cette différence pourrait venir d'une quantité accrue de EBNA-3A dans les cellules LCL-AT, hypothèse qui n'a pas été explorée du point de vue protéique, bien que le transcrit EBNA-3A ne soit pas différentiellement exprimé.

Cette différence pourrait venir plus vraisemblablement d'une activité augmentée de la protéine EBNA-3A. Cette tendance est également observée pour les gènes EBNA-3C et LMP-1 dans une moindre mesure.

d. Effet de l'IL21

L'effet de l'IL21 sur les LCL dépend de la durée de stimulation (Konforte et Paige, 2006). Durant les trois premiers jours de culture, l'IL21 induit la prolifération et la survie des LCL, avec une diminution de BZLF-1. Sur une culture au long terme après le troisième jour, l'IL21 induit une diminution de la prolifération, une augmentation de l'apoptose et une augmentation de BZLF-1. Elle induit également la différenciation des cellules infectées avec un phénotype de plasmocyte par l'expression de BLIMP-1 (Kis et al., 2010), et un phénotype de lymphocyte B cytotoxique avec l'expression de Granzyme B (Jahrsdörfer et al., 2006). Cette observation a également été réalisée *in vivo*, suggérant l'existence d'une population de lymphocytes B cytotoxiques régulateurs (Tabanelli et al., 2017 ; Hagn et al., 2015).

L'IL21 modifie la latence des cellules infectées par EBV *in vitro*, en imposant une latence de type II (Kis et al., 2010). Cela passe par une augmentation de LMP-1 et une baisse de EBNA-2 (Wu et al., 2017) qui selon les papiers est dépendante (Konforte et al., 2008) ou indépendante de la stimulation par IL21 (Kis et al., 2010 ; Nagy et al., 2012). La stimulation de nos lignées par l'IL21 sur 24 heures induit une surexpression de LMP-1 plus élevée dans les lignées LCL-WT, mais pas de modifications de EBNA-2, qui semble indépendant de la stimulation par l'IL21 dans le contexte de l'expérience.

Les résultats du RNA-seq réalisé sur les LCL-WT et LCL-AT avant et après stimulation par IL21 montrent que les LCL-AT ont un défaut de réponse à l'IL21 par rapport aux LCL-WT, avec quatre fois moins de gènes différentiellement exprimés suivant la stimulation, ainsi que moins de gènes de réponse à l'IL21. Aucune différence n'a été observée pour l'expression du récepteur à l'IL21 entre les LCL-WT et les LCL-AT. Un phosphokinome réalisé sur un seul couple de LCL-WT et LCL-AT avant et après stimulation par l'IL21, montre que la LCL-AT non stimulé a un phosphokinome très proche de celle de la LCL-WT stimulé, suggérant une activation basale des voies de l'IL21 dans les LCL-AT.

Ces résultats doivent encore être confirmés par d'autres analyses. Cependant, les résultats du RNA-seq comparant les LCL-AT et les LCL-WT en condition basale, montrent que les lignées LCL-AT ont un phénotype B plus différencié que les LCL-WT, ce qui est en accord avec une activation basale des voies de l'IL21.

2. Pertinence du modèle LCL

Les progrès de la recherche biomédicale ont été accélérés grâce à la possibilité d'avoir du matériel biologique en quantité non limitante, contrairement aux échantillons issus de patients. Une des contributions majeures a été la capacité d'établir des lignées lymphoblastoïdes, depuis la découverte du virus EBV en 1964 (Epstein et al.). Les LCL peuvent être générés à partir de moins de 5 mL de sang, sont très faciles à mettre en culture (Omi et al., 2017) et constituent une ressource illimitée d'ADN, d'ARN et de protéines humaines. L'analyse de ces lignées introduit cependant de nombreux biais, que nous décrivons dans cette section.

Les LCL utilisés au cours de cette thèse ont été générés au Généthon et au Centre de Ressources Biologiques de l'institut Imagine à différents moments. Elles possèdent donc un nombre de passages et un nombre de cycles de congélation/décongélation différents, ce qui pourrait constituer un biais pour nos analyses. Le transcriptome d'une LCL est proche de celui de son hôte source au cours des premiers passages (<5) suivant sa génération (McCarthy et al., 2016). Au fur et à mesure des passages et des cycles de congélation/décongélation, l'expression des gènes se modifie (Toritsuka et al., 2018) et efface progressivement la signature spécifique de l'hôte pour tendre vers un transcriptome plus uniforme entre LCL (Çalışkan et al., 2014). Les LCL maintiennent leur stabilité génétique au fil des passages (Scheinfeldt et al., 2018) et ne génèrent pas de nouveaux SNP par rapport aux PBMC dont elles sont issues (Herbeck et al., 2009). En revanche, les variants structuraux s'accumulent au cours des passages ultérieurs (>50) (Scheinfeldt et al., 2018), dont les variations du nombre de copies (Joesch-Cohen et Glusman, 2017).

Le biais du nombre de passages et de cycles de congélation/décongélation différents entre nos lignées existe, mais est relativement modéré ; le nombre de passages de nos lignées se situant vraisemblablement entre 5 et 50. Ces dernières ont subi suffisamment de passages et de cycles de congélation/décongélation pour avoir un transcriptome plus uniforme, avec cependant un nombre raisonnable pour éviter l'accumulation de variants structuraux. Ces informations ne sont valables uniquement pour les LCL-WT, il se pourrait que les LCL-AT accumulent des anomalies génétiques au fil des passages en raison de la mutation du gène *ATM*, introduisant un biais supplémentaire à notre étude.

Le projet 1000 génomes a permis le séquençage de 3 775 LCL dans le but de caractériser les différents SNP du génome humain, dont 465 ont aussi été étudiés par RNA-seq (<http://www.internationalgenome.org/>). L'étude des résultats de RNA-seq a permis de montrer qu'il existait toutefois une variabilité d'expression des gènes non négligeable au sein des LCL (Mandage et al., 2017). Le nombre de copies du génome EBV par cellule est stable au fil des passages et au sein d'une même lignée. Il est cependant très différent entre LCL, avec une variation allant de 15 à 180 copies par cellule (Mandage et al., 2017). Cette différence du nombre de copies semble très liée au génotype (Houldcroft et al., 2014) et influence l'expression des gènes viraux (Zuo et al., 2015). Notre analyse de ces 465 RNA-seq montre néanmoins qu'il y a peu de variations pour l'expression des gènes de latence, suggérant un effet modeste du nombre de copies du génome de l'EBV sur l'expression des gènes de latence. Le taux d'expression du génome de l'EBV, composé principalement de l'expression des gènes du cycle lytique, peut varier d'un facteur 20 entre LCL (Xu et al., 2014) et semble être dû au taux variable de réactivation du cycle lytique au sein des LCL. Ceci influe significativement l'expression des résultats de RNA-seq des gènes de cycles lytique mais nous avons montré que l'expression des gènes de latence demeure relativement stable et pouvait tout de même être analysée.

Aucune méthode n'a pour le moment été utilisée pour déterminer le taux précis de cellules réactivant le cycle lytique dans une culture de LCL. Cela est d'autant plus difficile que certaines cellules pourraient induire un cycle lytique abortif, ne conduisant qu'à l'activation d'un nombre restreint de gènes du cycle lytique (Al Tabaa et al., 2011).

L'expression des gènes du cycle lytique ne peut donc pas être étudiée à partir d'un RNA-seq de LCL. Cette technique ne nous permet pas non plus de savoir si les cellules en latence expriment également une partie des gènes de cycle lytique. Cependant l'analyse des cellules par single-cell RNA-seq pourrait permettre de mieux caractériser l'expression des gènes de l'EBV au sein des LCL.

Un autre biais vient du fait que l'expression des gènes viraux est variable au cours du temps. L'expression de LMP-1 peut varier d'un facteur 100 entre les cellules d'une même LCL ([Lam et al., 2004](#)). Après un tri des cellules exprimant peu et beaucoup LMP-1, l'expression de LMP-1 fluctue rapidement entre ces groupes pour redonner un taux d'expression intermédiaire ([Lee et Sugden, 2008](#) ; [Brooks et al., 2009](#)). Les études par RT-PCR quantitative au cours de cette thèse montrent que le taux de LMP-1 au sein d'une même lignée varie au cours du temps, bien que ces lignées soient remplacées environ toutes les 6 semaines par des lignées fraîches provenant de tubes congelés. Ces variations ne semblent pas venir d'un biais technique car l'analyse concomitante de deux échantillons d'une même lignée par RT-PCR quantitative donne des résultats concordants.

Le Crispr serait le système idéal pour se passer des biais cités ci-dessus. Toutefois, la transfection des LCL a été testée en utilisant plusieurs techniques sans succès. Bien que la transfection et la transduction des LCL aient déjà été décrites dans la littérature, ces lignées demeurent très difficilement transfectables et transductibles. Une des hypothèses pour expliquer cela est que ces cellules possèdent déjà du matériel viral, ce qui les met en condition d'empêcher l'entrée de tout nouveau matériel viral ou plasmidique. Le Crispr pourrait être de nouveau testé en utilisant des techniques de transfection plus précises et plus performantes, voire en transfectant directement la protéine Cas9 et l'ARN guide par nanoélectroporation.

3. Perspective : implication d'ATM dans les étapes précoces de l'infection

In vitro, le processus de transformation des lymphocytes B par EBV pour générer des LCL prend quelques semaines. La variation de l'expression des gènes viraux et cellulaires au cours de ce processus n'a jamais été évaluée. ATM pourrait être impliquée dans les premières étapes de cette transformation, favorisant l'oncogenèse EBV induite durant les phases précoces de l'infection. Pour tester cette hypothèse, des lymphocytes B de donneurs sains et de patients atteints d'AT pourraient être isolés et infectés *in vitro* par EBV. Un échantillon pourrait être prélevé à J0, J1, J3, J7 et J14 en vue de la réalisation d'un RNA seq. Cela permettrait de voir la cinétique de modification de l'expression des gènes cellulaires et viraux depuis l'infection à la génération de la lignée stable. Un séquençage de l'ADN pourrait également être réalisé avant infection et à l'établissement de la lignée, pour vérifier si de nouvelles mutations apparaissent suite à l'infection (Figure 25). Cette expérience n'a pas pu être faite au cours de cette thèse car les lymphocytes B à J0 possèdent très peu d'ARN ; il en faudrait une trop grande quantité pour avoir la quantité d'ARN suffisante pour un séquençage sur notre plateforme. Il serait dans ce cas plus pertinent d'utiliser des méthodes de RNA seq ultra sensibles pour y arriver, comme du single cell RNA seq.

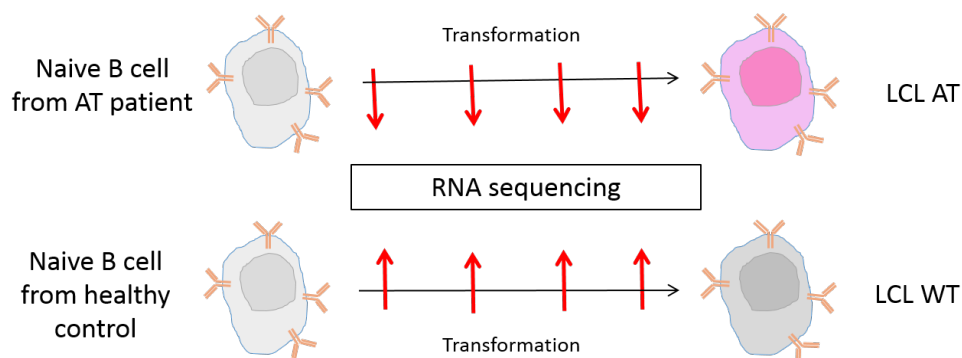


Figure 25 : Schéma de la série de RNA-seq permettant l'étude des étapes précoces de l'infection par EBV. Des lymphocytes B naïfs de patients atteints d'AT et de donneurs sains pourront être infectés *in vitro* par EBV, puis leur ARN pourra être séquençé à différents temps au cours de l'établissement de la LCL.

L'utilisation de souris pour étudier l'EBV est impossible à l'état basal, en raison de la spécificité du virus pour les cellules humaines. Il existe cependant des souris immunodéprimées « humanisées », transplantées avec des cellules de moelle osseuse humaine après irradiation pour reconstituer les lignées sanguines humaines.

Les souris humanisées sont un modèle puissant pour étudier les stades précoces de l'infection par le virus EBV, l'établissement de la latence III et la réponse du système immunitaire (Münz, 2015). Cependant, l'ontologie des lymphocytes B n'est pas complète chez ces souris, avec une absence de maturation des gènes du BCR et une absence de génération de centre germinatifs, empêchant ainsi l'étude des latences II et I. En outre, l'infection lytique ne peut avoir lieu en raison de l'absence de cellules épithéliales humaines. Les progrès récents ont considérablement amélioré l'ontogenèse des lymphocytes B chez ces souris par greffe de thymus humain et pourraient ouvrir un nouveau champ pour l'étude de l'EBV. Une infection de ces cellules par l'EBV n'a, à notre connaissance, pas encore été évaluée.

4. Conclusion

En résumé, nous montrons que les LCL-AT ont un phénotype oncogénique et un transcriptome compatible avec l'augmentation de l'incidence d'EBV-LPD observée chez les patients atteints d'AT. Ces lignées ont également un défaut de traduction marqué qui ne semble pas impacter le cycle cellulaire. L'analyse de l'expression des gènes de l'EBV dans les LCL-AT ne montre pas de dérégulation de la latence de l'EBV. Plus que le niveau d'expression en lui-même, l'activité des protéines de latences semble augmentée dans les LCL-AT. Les lignées LCL-AT ont également un défaut de réponse à l'IL21, qui apparaît comme étant corrélé à l'activation basale de la cascade de signalisation médiée par l'IL21. D'autres explorations sont nécessaires pour confirmer ces résultats.

Les études sur les mécanismes de la lymphomagenèse induite par EBV chez des patients atteints d'AT pourraient mettre en lumière sur les voies impliquées dans le contrôle de l'infection chronique à l'EBV et permettraient une meilleure compréhension de la physiopathologie des lymphomes associés à l'EBV, même en dehors du contexte de l'AT. Le rôle suppresseur de tumeur d'ATM, est mis en évidence par les mutations somatiques ou délétions acquises fréquentes d'*ATM* dans de nombreuses tumeurs malignes lymphoïdes. Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre l'exploration de nouvelles cibles thérapeutiques dans ces lymphomes, pour lesquels il n'existe toujours pas de traitement efficace ciblant l'EBV, et chez les patients atteints d'AT où les approches thérapeutiques habituelles comportant des agents cytotoxiques sont limitées par leur toxicité dans le cadre du défaut de la réparation de l'ADN.

REFERENCES

- Al Tabaa, Yassine, Edouard Tuailon, Eric Jeziorski, David Eric Ouedraogo, Karine Bolloré, Pierre-Alain Rubbo, Vincent Foulongne, Michel Rodière, et Jean-Pierre Vendrell. 2011. « B-Cell Polyclonal Activation and Epstein-Barr Viral Abortive Lytic Cycle Are Two Key Features in Acute Infectious Mononucleosis ». *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 52 (1): 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.05.023>.
- Alexander, Angela, Sheng-Li Cai, Jinhee Kim, Adrian Nanez, Mustafa Sahin, Kirsteen H. MacLean, Ken Inoki, et al. 2010. « ATM Signals to TSC2 in the Cytoplasm to Regulate MTORC1 in Response to ROS ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (9): 4153-58. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913860107>.
- Alfieri, C., M. Birkenbach, et E. Kieff. 1991. « Early Events in Epstein-Barr Virus Infection of Human B Lymphocytes ». *Virology* 181 (2): 595–608.
- Altmann, Markus, et Wolfgang Hammerschmidt. 2005. « Epstein-Barr Virus Provides a New Paradigm: A Requirement for the Immediate Inhibition of Apoptosis ». *PLOS Biology* 3 (12): e404. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030404>.
- Amaral, Joana D., Joana M. Xavier, Clifford J. Steer, et Cecilia M. Rodrigues. 2010. « The Role of p53 in Apoptosis ». *Discovery Medicine* 9 (45): 145–152.
- Ambrose, Mark, Jimena V. Goldstine, et Richard A. Gatti. 2007. « Intrinsic Mitochondrial Dysfunction in ATM-Deficient Lymphoblastoid Cells ». *Human Molecular Genetics* 16 (18): 2154–2164. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm166>.
- Amon, Wolfgang, et Paul J. Farrell. 2005. « Reactivation of Epstein-Barr Virus from Latency ». *Reviews in Medical Virology* 15 (3): 149–156. <https://doi.org/10.1002/rmv.456>.
- Antsiferova, Olga, Anne Müller, Patrick C. Rämer, Obinna Chijioko, Bithi Chatterjee, Ana Raykova, Raquel Planas, et al. 2014. « Adoptive Transfer of EBV Specific CD8+ T Cell Clones Can Transiently Control EBV Infection in Humanized Mice ». *PLoS Pathogens* 10 (8): e1004333. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004333>.

- Avery, Danielle T., Elissa K. Deenick, Cindy S. Ma, Santi Suryani, Nicholas Simpson, Gary Y. Chew, Tyani D. Chan, et al. 2010. « B Cell-Intrinsic Signaling through IL-21 Receptor and STAT3 Is Required for Establishing Long-Lived Antibody Responses in Humans ». *The Journal of Experimental Medicine* 207 (1): 155-71. <https://doi.org/10.1084/jem.20091706>.
- Babcock, Gregory J, Lisa L Decker, Mark Volk, et David A Thorley-Lawson. 1998. « EBV Persistence in Memory B Cells *In Vivo* ». *Immunity* 9 (3): 395–404. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80622-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80622-6).
- Bakkenist, Christopher J., et Michael B. Kastan. 2003. « DNA Damage Activates ATM through Intermolecular Autophosphorylation and Dimer Dissociation ». *Nature* 421 (6922): 499–506. <https://doi.org/10.1038/nature01368>.
- Beamish, H., et M. F. Lavin. 1994. « Radiosensitivity in Ataxia-Telangiectasia: Anomalies in Radiation-Induced Cell Cycle Delay ». *International Journal of Radiation Biology* 65 (2): 175–184.
- Bhende, Prasanna M., William T. Seaman, Henri-Jacques Delecluse, et Shannon C. Kenney. 2005. « BZLF1 Activation of the Methylated Form of the BRLF1 Immediate-Early Promoter Is Regulated by BZLF1 Residue 186 ». *Journal of Virology* 79 (12): 7338–7348. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.12.7338-7348.2005>.
- Bibas, Michele, et Andrea Antinori. 2009. « EBV and HIV-Related Lymphoma ». *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 1 (2): e2009032. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2009.032>.
- Boder, E., et R. P. Sedgwick. 1958. « Ataxia-Telangiectasia; a Familial Syndrome of Progressive Cerebellar Ataxia, Oculocutaneous Telangiectasia and Frequent Pulmonary Infection ». *Pediatrics* 21 (4): 526–554.
- Bongartz, CM. 2017. « INKT-Zellzahlen bei Kindern mit erworbener und angeborener Immundefizienz. » <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=42409>.
- Borel, J. F., C. Feurer, C. Magnée, et H. Stähelin. 1977. « Effects of the New Anti-Lymphocytic Peptide Cyclosporin A in Animals ». *Immunology* 32 (6): 1017–1025.

- Bose, Shikha, Lee-Fah Yap, Matthew Fung, Jane Starzcynski, Amyza Saleh, Susan Morgan, Christopher Dawson, et al. 2009. « The ATM Tumour Suppressor Gene Is Down-Regulated in EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma ». *The Journal of Pathology* 217 (3): 345–352.
<https://doi.org/10.1002/path.2487>.
- Bredemeyer, Andrea L., Girdhar G. Sharma, Ching-Yu Huang, Beth A. Helmink, Laura M. Walker, Katrina C. Khor, Beth Nuskey, et al. 2006. « ATM Stabilizes DNA Double-Strand-Break Complexes during V(D)J Recombination ». *Nature* 442 (7101): 466–470. <https://doi.org/10.1038/nature04866>.
- Brinkman, Eva K., Tao Chen, Mario Amendola, et Bas van Steensel. 2014. « Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition ». *Nucleic Acids Research* 42 (22): e168.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku936>.
- Brooks, Jill M., Steven P. Lee, Alison M. Leese, Wendy A. Thomas, Martin Rowe, et Alan B. Rickinson. 2009. « Cyclical Expression of EBV Latent Membrane Protein 1 in EBV-Transformed B Cells Underpins Heterogeneity of Epitope Presentation and CD8+ T Cell Recognition ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (4): 1919-28. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0713607>.
- Brooks, L., Q. Y. Yao, A. B. Rickinson, et L. S. Young. 1992. « Epstein-Barr Virus Latent Gene Transcription in Nasopharyngeal Carcinoma Cells: Coexpression of EBNA1, LMP1, and LMP2 Transcripts ». *Journal of Virology* 66 (5): 2689–2697.
- Busson, P., Tadamassa Ooka T., et Marilyns Corbex. « Carcinomes nasopharyngés associés au virus d'Epstein-Barr : de l'épidémiologie à la thérapeutique et au dépistage ». *M/S : médecine sciences* 20, n° 4 (2004): 453-57.
- Caldwell, R. G., J. B. Wilson, S. J. Anderson, et R. Longnecker. 1998. « Epstein-Barr Virus LMP2A Drives B Cell Development and Survival in the Absence of Normal B Cell Receptor Signals ». *Immunity* 9 (3): 405–411.
- Çalışkan, Minal, Jonathan K. Pritchard, Carole Ober, et Yoav Gilad. 2014. « The Effect of Freeze-Thaw Cycles on Gene Expression Levels in Lymphoblastoid Cell Lines ». *PLoS One* 9 (9): e107166.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107166>.

- Callan, Margaret F. C., Neil Steven, Pete Krausa, Jamie D. K. Wilson, Paul A. H. Moss, Geraldine M. Gillespie, John I. Bell, Alan B. Rickinson, et Andrew J. McMichael. 1996. « Large Clonal Expansions of CD8+ T Cells in Acute Infectious Mononucleosis ». *Nature Medicine* 2 (8): 906–911.
<https://doi.org/10.1038/nm0896-906>.
- Carbonari, M., M. Cherchi, R. Paganelli, G. Giannini, E. Galli, C. Gaetano, C. Papetti, et M. Fiorilli. 1990. « Relative Increase of T Cells Expressing the Gamma/Delta Rather than the Alpha/Beta Receptor in Ataxia-Telangiectasia ». *The New England Journal of Medicine* 322 (2): 73–76.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199001113220201>.
- Carney, Ellen F., Venkataramanan Srinivasan, Paul A. Moss, et A. Malcolm Taylor. 2012. « Classical Ataxia Telangiectasia Patients Have a Congenitally Aged Immune System with High Expression of CD95 ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 189 (1): 261–268.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101909>.
- Chaigne-Delalande, Benjamin, Feng-Yen Li, Geraldine M. O'Connor, Marshall J. Lukacs, Ping Jiang, Lixin Zheng, Amber Shatzer, et al. 2013. « Mg²⁺ Regulates Cytotoxic Functions of NK and CD8 T Cells in Chronic EBV Infection through NKG2D ». *Science (New York, N.Y.)* 341 (6142): 186–191.
<https://doi.org/10.1126/science.1240094>.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, M. Appel, et T. D. Halazonetis. 2000. « Chk2/HCds1 Functions as a DNA Damage Checkpoint in G(1) by Stabilizing p53 ». *Genes & Development* 14 (3): 278–288.
- Chijioke, Obinna, Anne Müller, Regina Feederle, Mario Henrique M. Barros, Carsten Krieg, Vanessa Emmel, Emanuela Marcenaro, et al. 2013. « Human Natural Killer Cells Prevent Infectious Mononucleosis Features by Targeting Lytic Epstein-Barr Virus Infection ». *Cell Reports* 5 (6): 1489–1498.
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.11.041>.
- Chiu, Li-Ya, Fade Gong, et Kyle M. Miller. 2017. « Bromodomain Proteins: Repairing DNA Damage within Chromatin ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 372 (1731). <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0286>.

- Choudhuri, Tathagata, Subhash C. Verma, Ke Lan, Masanao Murakami, et Erle S. Robertson. 2007. « The ATM/ATR Signaling Effector Chk2 Is Targeted by Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C To Release the G2/M Cell Cycle Block ». *Journal of Virology* 81 (12): 6718–6730. <https://doi.org/10.1128/JVI.00053-07>.
- Chung, Brian K., Kevin Tsai, Lenka L. Allan, Dong Jun Zheng, Johnny C. Nie, Catherine M. Biggs, Mohammad R. Hasan, et al. 2013. « Innate Immune Control of EBV-Infected B Cells by Invariant Natural Killer T Cells ». *Blood* 122 (15): 2600–2608. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-01-480665>.
- Cohen, Jeffrey I. 2015. « Primary Immunodeficiencies Associated with EBV Disease ». *Current Topics in Microbiology and Immunology* 390 (Pt 1): 241-65. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_10.
- Cohen, Melina, Aldana Georgina Vistarop, Fuad Huaman, Marina Narbaitz, Fernanda Metrebian, Elena De Matteo, María Victoria Preciado, et Paola Andrea Chabay. 2018. « Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Involvement in Diffuse Large B Cell Lymphoma ». *Hematological Oncology* 36 (1): 98–103. <https://doi.org/10.1002/hon.2465>.
- Cosentino, Claudia, Domenico Grieco, et Vincenzo Costanzo. 2011. « ATM Activates the Pentose Phosphate Pathway Promoting Anti-Oxidant Defence and DNA Repair ». *The EMBO Journal* 30 (3): 546–555. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.330>.
- Crawford, T. O., R. L. Skolasky, R. Fernandez, K. J. Rosquist, et H. M. Lederman. 2006. « Survival Probability in Ataxia Telangiectasia ». *Archives of Disease in Childhood* 91 (7): 610–611. <https://doi.org/10.1136/adc.2006.094268>.
- Czornak, Kamila, Sanaullah Chughtai, et Krystyna H. Chrzanowska. 2008. « Mystery of DNA Repair: The Role of the MRN Complex and ATM Kinase in DNA Damage Repair ». *Journal of Applied Genetics* 49 (4): 383–396. <https://doi.org/10.1007/BF03195638>.
- Díaz-Muñoz, Manuel D., Vladimir Yu Kiselev, Nicolas Le Novère, Tomaz Curk, Jernej Ule, et Martin Turner. 2017. « Tia1 Dependent Regulation of mRNA Subcellular Location and Translation Controls p53 Expression in B Cells ». *Nature Communications* 8 (1): 530. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00454-2>.

- Donaldson, A. D., et J. J. Blow. 1999. « The Regulation of Replication Origin Activation ». *Current Opinion in Genetics & Development* 9 (1): 62–68.
- Dutton, Amanda, Ciaran B. Woodman, Marilyn B. Chukwuma, James I. K. Last, Wenbin Wei, Martina Vockerodt, Karl R. N. Baumforth, et al. 2007. « Bmi-1 Is Induced by the Epstein-Barr Virus Oncogene LMP1 and Regulates the Expression of Viral Target Genes in Hodgkin Lymphoma Cells ». *Blood* 109 (6): 2597–2603. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-020545>.
- Dykstra, M. L., R. Longnecker, et S. K. Pierce. 2001. « Epstein-Barr Virus Coopts Lipid Rafts to Block the Signaling and Antigen Transport Functions of the BCR ». *Immunity* 14 (1): 57-67.
- Elmore, E., et M. Swift. 1976. « Growth of Cultured Cells from Patients with Ataxia-Telangiectasia ». *Journal of Cellular Physiology* 89 (3): 429-31. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040890308>.
- Epstein, M. A., B. G. Achong, et Y. M. Barr. 1964. « VIRUS PARTICLES IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA ». *Lancet (London, England)* 1 (7335): 702–703.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuåsen, J. Bartek, et J. Lukas. 2001. « The ATM-Chk2-Cdc25A Checkpoint Pathway Guards against Radioresistant DNA Synthesis ». *Nature* 410 (6830): 842–847. <https://doi.org/10.1038/35071124>.
- Feng, Bing-Jian. « Descriptive, Environmental and Genetic Epidemiology of Nasopharyngeal Carcinoma ». In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*, édité par Pierre Busson, 23-41. Advances in Experimental Medicine and Biology. New York, NY: Springer New York, 2013. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-5947-7_3.
- Fernandes, Norvin, Yingli Sun, Shujuan Chen, Prama Paul, Reuben J. Shaw, Lewis C. Cantley, et Brendan D. Price. 2005. « DNA Damage-Induced Association of ATM with Its Target Proteins Requires a Protein Interaction Domain in the N Terminus of ATM ». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (15): 15158–15164. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412065200>.
- Gent, D. C. van, et M. van der Burg. 2007. « Non-Homologous End-Joining, a Sticky Affair ». *Oncogene* 26 (56): 7731–7740. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210871>.

- Giovanella, B., K. Nilsson, L. Zech, O. Yim, G. Klein, et J. S. Stehlin. 1979. « Growth of Diploid, Epstein-Barr Virus-Carrying Human Lymphoblastoid Cell Lines Heterotransplanted into Nude Mice under Immunologically Privileged Conditions ». *International Journal of Cancer* 24 (1): 103-13.
- Goedecke, W., M. Eijpe, H. H. Offenbergh, M. van Aalderen, et C. Heyting. 1999. « Mre11 and Ku70 Interact in Somatic Cells, but Are Differentially Expressed in Early Meiosis ». *Nature Genetics* 23 (2): 194–198.
<https://doi.org/10.1038/13821>.
- Gruhne, B., R. Sompallae, et M. G. Masucci. 2009. « Three Epstein–Barr Virus Latency Proteins Independently Promote Genomic Instability by Inducing DNA Damage, Inhibiting DNA Repair and Inactivating Cell Cycle Checkpoints ». *Oncogene* 28 (45): 3997–4008.
<https://doi.org/10.1038/onc.2009.258>.
- Gruhne, Bettina, Ramakrishna Sompallae, Diego Marescotti, Siamak Akbari Kamranvar, Stefano Gastaldello, et Maria G. Masucci. 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 (7): 2313–2318.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0810619106>.
- Hagemeyer, S. R., E. A. Barlow, Q. Meng, et S. C. Kenney. 2012. « The Cellular Ataxia Telangiectasia-Mutated Kinase Promotes Epstein-Barr Virus Lytic Reactivation in Response to Multiple Different Types of Lytic Reactivation-Inducing Stimuli ». *Journal of Virology* 86 (24): 13360-70.
<https://doi.org/10.1128/JVI.01850-12>.
- Hagn, Magdalena, Archana Panikkar, Corey Smith, Henry H. Balfour, Rajiv Khanna, Ilia Voskoboinik, et Joseph A. Trapani. 2015. « B Cell-Derived Circulating Granzyme B Is a Feature of Acute Infectious Mononucleosis ». *Clinical & Translational Immunology* 4 (6): e38.
<https://doi.org/10.1038/cti.2015.10>.
- Hämmerl, Lucia, Murielle Colombet, Rosemary Rochford, David Martin Ogowang, et Donald Maxwell Parkin. « The Burden of Burkitt Lymphoma in Africa ». *Infectious Agents and Cancer* 14 (2019): 17.
<https://doi.org/10.1186/s13027-019-0236-7>.

- Hansmann, M. L., K. Hell, et R. Küppers. 1995. « [Hodgkin cells are clonal B-cells in various stages of differentiation] ». *Der Pathologe* 16 (2): 88–93.
- Harding, Shane M., Jonathan A. Boiarsky, et Roger A. Greenberg. 2015. « ATM Dependent Silencing Links Nucleolar Chromatin Reorganization to DNA Damage Recognition ». *Cell Reports* 13 (2): 251-59. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.085>.
- Hau, Pok Man, Wen Deng, Lin Jia, Jie Yang, Tatsuya Tsurumi, Alan Kwok Shing Chiang, Michael Shing-Yan Huen, et Sai Wah Tsao. 2015. « Role of ATM in the Formation of the Replication Compartment during Lytic Replication of Epstein-Barr Virus in Nasopharyngeal Epithelial Cells ». *Journal of Virology* 89 (1): 652-68. <https://doi.org/10.1128/JVI.01437-14>.
- Hawkins, Jared B., Edgar Delgado-Eckert, David A. Thorley-Lawson, et Michael Shapiro. 2013. « The Cycle of EBV Infection Explains Persistence, the Sizes of the Infected Cell Populations and Which Come under CTL Regulation ». *PLOS Pathogens* 9 (10): e1003685. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003685>.
- Hedrick, J. A., D. Watry, C. Speiser, P. O'Donnell, J. D. Lambris, et C. D. Tsoukas. 1992. « Interaction between Epstein-Barr Virus and a T Cell Line (HSB-2) via a Receptor Phenotypically Distinct from Complement Receptor Type 2 ». *European Journal of Immunology* 22 (5): 1123–1131. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220504>.
- Henderson, E., G. Miller, J. Robinson, et L. Heston. 1977. « Efficiency of Transformation of Lymphocytes by Epstein-Barr Virus ». *Virology* 76 (1): 152–163.
- Herbeck, Joshua T., Geoffrey S. Gottlieb, Kim Wong, Roger Detels, John P. Phair, Charles R. Rinaldo, Lisa P. Jacobson, Joseph B. Margolick, et James I. Mullins. 2009. « Fidelity of SNP Array Genotyping Using Epstein Barr Virus-Transformed B-Lymphocyte Cell Lines: Implications for Genome-Wide Association Studies ». *PloS One* 4 (9): e6915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006915>.

- Hesse, Jill E., Liwen Liu, Cynthia L. Innes, Yuxia Cui, Stela S. Palii, et Richard S. Paules. 2013. « Genome-Wide Small RNA Sequencing and Gene Expression Analysis Reveals a MicroRNA Profile of Cancer Susceptibility in ATM-Deficient Human Mammary Epithelial Cells ». *PLoS One* 8 (5): e64779. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064779>.
- Houldcroft, Charlotte J., Velislava Petrova, Jimmy Z. Liu, Dan Frampton, Carl A. Anderson, Astrid Gall, et Paul Kellam. 2014. « Host Genetic Variants and Gene Expression Patterns Associated with Epstein-Barr Virus Copy Number in Lymphoblastoid Cell Lines ». *PLoS One* 9 (10): e108384. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108384>.
- Hurley, E. A., et D. A. Thorley-Lawson. 1988. « B Cell Activation and the Establishment of Epstein-Barr Virus Latency ». *The Journal of Experimental Medicine* 168 (6): 2059–2075.
- Ivanov, Vladimir N., Hongning Zhou, Michael A. Partridge, et Tom K. Hei. 2009. « Inhibition of Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase Activity Enhances TRAIL-Mediated Apoptosis in Human Melanoma Cells ». *Cancer Research* 69 (8): 3510–3519. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3883>.
- Iwata, Seiko, Kaoru Wada, Satomi Tobita, Kensei Gotoh, Yoshinori Ito, Ayako Demachi-Okamura, Norio Shimizu, Yukihiro Nishiyama, et Hiroshi Kimura. 2010. « Quantitative Analysis of Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Gene Expression in Patients with Chronic Active EBV Infection ». *The Journal of General Virology* 91 (Pt 1): 42-50. <https://doi.org/10.1099/vir.0.013482-0>.
- Jahrsdörfer, Bernd, Sue E. Blackwell, James E. Wooldridge, Jian Huang, Melinda W. Andreski, Laura S. Jacobus, Christiana M. Taylor, et George J. Weiner. 2006. « B-Chronic Lymphocytic Leukemia Cells and Other B Cells Can Produce Granzyme B and Gain Cytotoxic Potential after Interleukin-21-Based Activation ». *Blood* 108 (8): 2712-19. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-03-014001>.
- Jiang, Hai, H. Christian Reinhardt, Jirina Bartkova, Johanna Tommiska, Carl Blomqvist, Heli Nevanlinna, Jiri Bartek, Michael B. Yaffe, et Michael T. Hemann. 2009. « The Combined Status of ATM and p53 Link Tumor Development with Therapeutic Response ». *Genes & Development* 23 (16): 1895-1909. <https://doi.org/10.1101/gad.1815309>.

- Joesch-Cohen, Lena M., et Gustavo Glusman. 2017. « Differences between the Genomes of Lymphoblastoid Cell Lines and Blood-Derived Samples ». *Advances in Genomics and Genetics* 7: 1-9. <https://doi.org/10.2147/AGG.S128824>.
- Kanda, Teru, Michele Otter, et Geoffrey M. Wahl. 2001. « Coupling of Mitotic Chromosome Tethering and Replication Competence in Epstein-Barr Virus-Based Plasmids ». *Molecular and Cellular Biology* 21 (10): 3576–3588. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.10.3576-3588.2001>.
- Kang, Myung-Soo, et Elliott Kieff. 2015. « Epstein–Barr Virus Latent Genes ». *Experimental & Molecular Medicine* 47 (1): e131. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.84>.
- Kelly, Gemma L., Heather M. Long, Julianna Stylianou, Wendy A. Thomas, Alison Leese, Andrew I. Bell, Georg W. Bornkamm, Josef Mautner, Alan B. Rickinson, et Martin Rowe. 2009. « An Epstein-Barr Virus Anti-Apoptotic Protein Constitutively Expressed in Transformed Cells and Implicated in Burkitt Lymphomagenesis: The Wp/BHRF1 Link ». *PLoS Pathogens* 5 (3): e1000341. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000341>.
- Kenney, Shannon C., et Janet E. Mertz. 2014. « Regulation of the latent-lytic switch in Epstein–Barr virus ». *Seminars in cancer biology* 0 (juin): 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2014.01.002>.
- Kersey, John H., Beatrice D. Spector, et Robert A. Good. 1973. « Primary Immunodeficiency Diseases and Cancer: The Immunodeficiency-Cancer Registry ». *International Journal of Cancer* 12 (2): 333-47. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910120204>.
- Khanna, R., S. R. Burrows, M. G. Kurilla, C. A. Jacob, I. S. Misko, T. B. Sculley, E. Kieff, et D. J. Moss. 1992. « Localization of Epstein-Barr Virus Cytotoxic T Cell Epitopes Using Recombinant Vaccinia: Implications for Vaccine Development ». *The Journal of Experimental Medicine* 176 (1): 169–176.
- Kim, Hyun-Jung, Young Hye Ko, Ji Eun Kim, Seung-Sook Lee, Hyekyung Lee, Gyeongsin Park, Jin Ho Paik, et al. 2017. « Epstein-Barr Virus–Associated Lymphoproliferative Disorders: Review and Update on 2016 WHO Classification ». *Journal of Pathology and Translational Medicine* 51 (4): 352–358. <https://doi.org/10.4132/jptm.2017.03.15>.

- Kis, Loránd L., Daniel Salamon, Emma K. Persson, Noémi Nagy, Ferenc A. Scheeren, Hergen Spits, George Klein, et Eva Klein. 2010. « IL-21 Imposes a Type II EBV Gene Expression on Type III and Type I B Cells by the Repression of C- and Activation of LMP-1-Promoter ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2): 872-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912920107>.
- Knight, Jason S., et Erle S. Robertson. 2004. « Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 3C Regulates Cyclin A/P27 Complexes and Enhances Cyclin A-Dependent Kinase Activity ». *Journal of Virology* 78 (4): 1981–1991.
- Ko, L. J., et C. Prives. 1996. « p53: Puzzle and Paradigm ». *Genes & Development* 10 (9): 1054–1072.
- Konforte, Danijela, et Christopher J. Paige. 2006. « Identification of Cellular Intermediates and Molecular Pathways Induced by IL-21 in Human B Cells ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (12): 8381-92.
- Konforte, Danijela, Nathalie Simard, et Christopher J. Paige. 2008. « Interleukin-21 Regulates Expression of Key Epstein-Barr Virus Oncoproteins, EBNA2 and LMP1, in Infected Human B Cells ». *Virology* 374 (1): 100-113. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.12.027>.
- Konforte, Danijela, et Christopher J. Paige. 2009. « Interleukin-21 Regulates Expression of the Immediate-Early Lytic Cycle Genes and Proteins in Epstein-Barr Virus Infected B Cells ». *Virus Research* 144 (1-2): 339-43. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.003>.
- Kotnis, Ashwin, Likun Du, Chonghai Liu, Sergey W. Popov, et Qiang Pan-Hammarström. 2009. « Non-Homologous End Joining in Class Switch Recombination: The Beginning of the End ». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 364 (1517): 653–665. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0196>.
- Kudoh, Ayumi, Masatoshi Fujita, Lumin Zhang, Noriko Shirata, Tohru Daikoku, Yutaka Sugaya, Hiroki Isomura, Yukihiro Nishiyama, et Tatsuya Tsurumi. 2005. « Epstein-Barr Virus Lytic Replication Elicits ATM Checkpoint Signal Transduction While Providing an S-Phase-like Cellular Environment ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (9): 8156-63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411405200>.

- Kudoh, Ayumi, Satoko Iwahori, Yoshitaka Sato, Sanae Nakayama, Hiroki Isomura, Takayuki Murata, et Tatsuya Tsurumi. 2009. « Homologous Recombinational Repair Factors Are Recruited and Loaded onto the Viral DNA Genome in Epstein-Barr Virus Replication Compartments ». *Journal of Virology* 83 (13): 6641–6651. <https://doi.org/10.1128/JVI.00049-09>.
- Kulinski, Joseph M., Steven M. Leonardo, Bryan C. Mounce, Laurent Malherbe, Stephen B. Gauld, et Vera L. Tarakanova. 2012. « Ataxia Telangiectasia Mutated Kinase Controls Chronic Gammaherpesvirus Infection ». *Journal of Virology* 86 (23): 12826-37. <https://doi.org/10.1128/JVI.00917-12>.
- Kulwichit, W., R. H. Edwards, E. M. Davenport, J. F. Baskar, V. Godfrey, et N. Raab-Traub. 1998. « Expression of the Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1 Induces B Cell Lymphoma in Transgenic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (20): 11963–11968.
- Kvansakul, Marc, Andrew H. Wei, Jamie I. Fletcher, Simon N. Willis, Lin Chen, Andrew W. Roberts, David C. S. Huang, et Peter M. Colman. 2010. « Structural Basis for Apoptosis Inhibition by Epstein-Barr Virus BHRF1 ». Édité par Jae U. Jung. *PLoS Pathogens* 6 (12): e1001236. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001236>.
- Lam, Ngan, Mark L. Sandberg, et Bill Sugden. 2004. « High Physiological Levels of LMP1 Result in Phosphorylation of EIF2 Alpha in Epstein-Barr Virus-Infected Cells ». *Journal of Virology* 78 (4): 1657-64.
- Lavin, Martin F. 2008. « Ataxia-Telangiectasia: From a Rare Disorder to a Paradigm for Cell Signalling and Cancer ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (10): 759-69. <https://doi.org/10.1038/nrm2514>.
- Lee, Dong Yun, et Bill Sugden. 2008. « The LMP1 Oncogene of EBV Activates PERK and the Unfolded Protein Response to Drive Its Own Synthesis ». *Blood* 111 (4): 2280-89. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-07-100032>.
- Lefton-Greif, M. A., T. O. Crawford, J. A. Winkelstein, G. M. Loughlin, C. B. Koerner, M. Zahurak, et H. M. Lederman. 2000. « Oropharyngeal Dysphagia and Aspiration in Patients with Ataxia-Telangiectasia ». *The Journal of Pediatrics* 136 (2): 225–231.

- Li, Feng-Yen, Benjamin Chaigne-Delalande, Chrysi Kanellopoulou, Jeremiah C. Davis, Helen F. Matthews, Daniel C. Douek, Jeffrey I. Cohen, Gulbu Uzel, Helen C. Su, et Michael J. Lenardo. 2011. « Second Messenger Role for Mg²⁺ Revealed by Human T-Cell Immunodeficiency ». *Nature* 475 (7357): 471-76. <https://doi.org/10.1038/nature10246>.
- Li, Q., M. K. Spriggs, S. Kovats, S. M. Turk, M. R. Comeau, B. Nepom, et L. M. Hutt-Fletcher. 1997. « Epstein-Barr Virus Uses HLA Class II as a Cofactor for Infection of B Lymphocytes ». *Journal of Virology* 71 (6): 4657–4662.
- Li, Q., S. M. Turk, et L. M. Hutt-Fletcher. 1995. « The Epstein-Barr Virus (EBV) BZLF2 Gene Product Associates with the GH and GL Homologs of EBV and Carries an Epitope Critical to Infection of B Cells but Not of Epithelial Cells ». *Journal of Virology* 69 (7): 3987–3994.
- Li, Renfeng, Jian Zhu, Zhi Xie, Gangling Liao, Jianyong Liu, Mei-Ru Chen, Shaohui Hu, et al. 2011. « Conserved Herpesvirus Kinases Target the DNA Damage Response Pathway and TIP60 Histone Acetyltransferase to Promote Virus Replication ». *Cell Host & Microbe* 10 (4): 390-400. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.08.013>.
- Lismont, Celien, Marcus Nordgren, Paul P. Van Veldhoven, et Marc Fransen. 2015. « Redox Interplay between Mitochondria and Peroxisomes ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 3: 35. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00035>.
- Liu, Q., S. Guntuku, X. S. Cui, S. Matsuoka, D. Cortez, K. Tamai, G. Luo, et al. 2000. « Chk1 Is an Essential Kinase That Is Regulated by Atr and Required for the G(2)/M DNA Damage Checkpoint ». *Genes & Development* 14 (12): 1448–1459.
- Lopez-Granados, E., M. Stacey, A.-K. Kienzler, S. Sierro, C. B. Willberg, C. P. Fox, S. Rigaud, et al. 2014. « A Mutation in X-Linked Inhibitor of Apoptosis (G466X) Leads to Memory Inflation of Epstein-Barr Virus-Specific T Cells ». *Clinical and Experimental Immunology* 178 (3): 470–482. <https://doi.org/10.1111/cei.12427>.

- Louis-Bar, Denise. 1941. « Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. » *Confinia Neurologica*, 4: 32–42.
- Lumsden, Joanne M., Thomas McCarty, Lisa K. Petiniot, Rhuna Shen, Carrolee Barlow, Thomas A. Wynn, Herbert C. Morse, et al. 2004. « Immunoglobulin Class Switch Recombination Is Impaired in Atm-Deficient Mice ». *The Journal of Experimental Medicine* 200 (9): 1111–1121.
<https://doi.org/10.1084/jem.20041074>.
- Ma, Xiaoqian, Lifang Yang, Lanbo Xiao, Min Tang, Liyu Liu, Zijian Li, Mengyao Deng, Lunquan Sun, et Ya Cao. 2011. « Down-Regulation of EBV-LMP1 Radio-Sensitizes Nasal Pharyngeal Carcinoma Cells via NF-κB Regulated ATM Expression ». *PLoS ONE* 6 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024647>.
- Maclean, Kirsteen H., Michael B. Kastan, et John L. Cleveland. 2007. « Atm Deficiency Affects Both Apoptosis and Proliferation to Augment Myc-Induced Lymphomagenesis ». *Molecular Cancer Research: MCR* 5 (7): 705-11. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0058>.
- Magrath, I. « Denis Burkitt and the African Lymphoma ». *Ecancermedicalscience* 3 (2009): 159.
<https://doi.org/10.3332/ecancer.2009.159>.
- Mandage, Rajendra, Marco Telford, Juan Antonio Rodríguez, Xavier Farré, Hafid Layouni, Urko M. Marigorta, Caitlin Cundiff, Jose Maria Heredia-Genestar, Arcadi Navarro, et Gabriel Santpere. 2017. « Genetic Factors Affecting EBV Copy Number in Lymphoblastoid Cell Lines Derived from the 1000 Genome Project Samples ». *PloS One* 12 (6): e0179446.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179446>.
- Martin, Emmanuel, Noé Palmic, Sylvia Sanquer, Christelle Lenoir, Fabian Hauck, Cédric Mongellaz, Sylvie Fabrega, et al. 2014. « CTP Synthase 1 Deficiency in Humans Reveals Its Central Role in Lymphocyte Proliferation ». *Nature* 510 (7504): 288-92. <https://doi.org/10.1038/nature13386>.

- Maruo, Seiji, Bo Zhao, Eric Johannsen, Elliott Kieff, James Zou, et Kenzo Takada. 2011. « Epstein-Barr Virus Nuclear Antigens 3C and 3A Maintain Lymphoblastoid Cell Growth by Repressing P16INK4A and P14ARF Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (5): 1919–1924. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019599108>.
- Maya, R., M. Balass, S. T. Kim, D. Shkedy, J. F. Leal, O. Shifman, M. Moas, et al. 2001. « ATM-Dependent Phosphorylation of Mdm2 on Serine 395: Role in p53 Activation by DNA Damage ». *Genes & Development* 15 (9): 1067–1077. <https://doi.org/10.1101/gad.886901>.
- Mayer, Sophia, Christine Wrenzycki, et Wolfgang Tomek. 2014. « Inactivation of MTor Arrests Bovine Oocytes in the Metaphase-I Stage, despite Reversible Inhibition of 4E-BP1 Phosphorylation ». *Molecular Reproduction and Development* 81 (4): 363-75. <https://doi.org/10.1002/mrd.22305>.
- McCarthy, Nina S., Spencer M. Allan, David Chandler, Assen Jablensky, et Bharti Morar. 2016. « Integrity of Genome-Wide Genotype Data from Low Passage Lymphoblastoid Cell Lines ». *Genomics Data* 9 (septembre): 18-21. <https://doi.org/10.1016/j.gdata.2016.05.006>.
- McGrath-Morrow, Sharon A., W. Adam Gower, Cynthia Rothblum-Oviatt, Alan S. Brody, Claire Langston, Leland L. Fan, Maureen A. Lefton-Greif, et al. 2010. « Evaluation and Management of Pulmonary Disease in Ataxia-Telangiectasia ». *Pediatric Pulmonology* 45 (9): 847–859. <https://doi.org/10.1002/ppul.21277>.
- Mehta, DS, AL Wurster, et MJ Whitters. s. d. « IL-21 induces the apoptosis of resting and activated primary B cells. - PubMed - NCBI ». Consulté le 2 mai 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12682241>.
- Méneret, Aurélie, Yara Ahmar-Beaugendre, Guillaume Rieunier, Nizar Mahlaoui, Bertrand Gaymard, Emmanuelle Apartis, Christine Tranchant, et al. 2014. « The Pleiotropic Movement Disorders Phenotype of Adult Ataxia-Telangiectasia ». *Neurology* 83 (12): 1087-95. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000794>.

- Micheli, R., S. Pirovano, G. Calandra, M. Valotti, A. Plebani, A. Albertini, et L. Imberti. 2003. « Low Thymic Output and Reduced Heterogeneity of Alpha/Beta, but Not Gamma/Delta, T Lymphocytes in Infants with Ataxia-Telangiectasia ». *Neuropediatrics* 34 (3): 165–167. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41280>.
- Micol, Romain, Lilia Ben Slama, Felipe Suarez, Loïc Le Mignot, Julien Beauté, Nizar Mahlaoui, Catherine Dubois d'Enghien, et al. 2011. « Morbidity and Mortality from Ataxia-Telangiectasia Are Associated with ATM Genotype ». *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 128 (2): 382–389.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.03.052>.
- Miller, C. L., A. L. Burkhardt, J. H. Lee, B. Stealey, R. Longnecker, J. B. Bolen, et E. Kieff. 1995. « Integral Membrane Protein 2 of Epstein-Barr Virus Regulates Reactivation from Latency through Dominant Negative Effects on Protein-Tyrosine Kinases ». *Immunity* 2 (2): 155–166.
- Miyashita, E. M., B. Yang, K. M. Lam, D. H. Crawford, et D. A. Thorley-Lawson. 1995. « A Novel Form of Epstein-Barr Virus Latency in Normal B Cells *in Vivo* ». *Cell* 80 (4): 593-601.
- Morales-Sánchez, Abigail, et Ezequiel M. Fuentes-Panana. 2018. « The Immunomodulatory Capacity of an Epstein-Barr Virus Abortive Lytic Cycle: Potential Contribution to Viral Tumorigenesis ». *Cancers* 10 (4). <https://doi.org/10.3390/cancers10040098>.
- Münz, Christian. « EBV Infection of Mice with Reconstituted Human Immune System Components ». In Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases, édité par Christian Münz, 407-23. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing, 2015. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22834-1_14.
- Nagy, Noémi, Mónika Adori, Abu Rasul, Frank Heuts, Daniel Salamon, Dorina Ujvári, Harsha S. Madapura, Benjamin Leveau, George Klein, et Eva Klein. 2012. « Soluble Factors Produced by Activated CD4+ T Cells Modulate EBV Latency ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (5): 1512-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1120587109>.

- Nemerow, G. R., R. Wolfert, M. E. McNaughton, et N. R. Cooper. 1985. « Identification and Characterization of the Epstein-Barr Virus Receptor on Human B Lymphocytes and Its Relationship to the C3d Complement Receptor (CR2) ». *Journal of Virology* 55 (2): 347–351.
- Nikitin, Pavel A., Christopher M. Yan, Eleonora Forte, Alessio Bocedi, Jason P. Tourigny, Robert E. White, Martin J. Allday, et al. 2010. « An ATM/Chk2-Mediated DNA Damage-Responsive Signaling Pathway Suppresses Epstein-Barr Virus Transformation of Primary Human B Cells ». *Cell Host & Microbe* 8 (6): 510-22. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.11.004>.
- Nowak-Wegrzyn, Anna, Thomas O. Crawford, Jerry A. Winkelstein, Kathryn A. Carson, et Howard M. Lederman. 2004. « Immunodeficiency and Infections in Ataxia-Telangiectasia ». *The Journal of Pediatrics* 144 (4): 505-11. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.12.046>.
- Ocampo, Christopher J., et Anju T. Peters. 2013. « Antibody Deficiency in Chronic Rhinosinusitis: Epidemiology and Burden of Illness ». *American Journal of Rhinology & Allergy* 27 (1): 34–38. <https://doi.org/10.2500/ajra.2013.27.3831>.
- Odumade, Oludare A., Kristin A. Hogquist, et Henry H. Balfour. 2011. « Progress and Problems in Understanding and Managing Primary Epstein-Barr Virus Infections ». *Clinical Microbiology Reviews* 24 (1): 193–209. <https://doi.org/10.1128/CMR.00044-10>.
- Okano, M, F Mizuno, T Aya, T Osato, Y Sakiyama, et S Matsumoto. 1993. « EPSTEIN-BARR-VIRUS HYPERSENSITIVITY OF LYMPHOCYTES FROM PATIENTS WITH ATAXIA-TELANGIECTASIA ». *International Journal of Oncology*, juin. <https://doi.org/10.3892/ijco.2.6.1027>.
- Olofsson, B. A., C. M. Kelly, J. Kim, S. M. Hornsby, et J. Azizkhan-Clifford. 2007. « Phosphorylation of Sp1 in Response to DNA Damage by Ataxia Telangiectasia-Mutated Kinase ». *Molecular Cancer Research* 5 (12): 1319–1330. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-0374>.
- Omi, Natsue, Yuichi Tokuda, Yoko Ikeda, Morio Ueno, Kazuhiko Mori, Chie Sotozono, Shigeru Kinoshita, Masakazu Nakano, et Kei Tashiro. 2017. « Efficient and Reliable Establishment of Lymphoblastoid Cell Lines by Epstein-Barr Virus Transformation from a Limited Amount of Peripheral Blood ». *Scientific Reports* 7: 43833. <https://doi.org/10.1038/srep43833>.

- Painter, R. B., et B. R. Young. 1980. « Radiosensitivity in Ataxia-Telangiectasia: A New Explanation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77 (12): 7315–7317.
- Palendira, Umaimainthan, et Alan B. Rickinson. 2015. « Primary Immunodeficiencies and the Control of Epstein-Barr Virus Infection ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1356 (novembre): 22–44. <https://doi.org/10.1111/nyas.12937>.
- Pan, Qiang, Corinne Petit-Frére, Aleksis Lähdesmäki, Hanna Gregorek, Krystyna H. Chrzanowska, et Lennart Hammarström. 2002. « Alternative End Joining during Switch Recombination in Patients with Ataxia-Telangiectasia ». *European Journal of Immunology* 32 (5): 1300-1308. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200205\)32:5<1300::AID-IMMU1300>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200205)32:5<1300::AID-IMMU1300>3.0.CO;2-L).
- Pashankar, Farzana, Vibha Singhal, Ike Akabogu, Richard A. Gatti, et Frederick D. Goldman. 2006. « Intact T Cell Responses in Ataxia Telangiectasia ». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 120 (2): 156–162. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.04.568>.
- Pradelli, Ludivine A., Marie Bénétéau, et Jean-Ehrland Ricci. 2010. « Mitochondrial Control of Caspase-Dependent and -Independent Cell Death ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 67 (10): 1589–1597. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0285-y>.
- Raab-Traub, N., P. Rajadurai, K. Flynn, et A. P. Lanier. 1991. « Epstein-Barr Virus Infection in Carcinoma of the Salivary Gland ». *Journal of Virology* 65 (12): 7032–7036.
- Reichenbach, J., R. Schubert, J. Feinberg, O. Beck, M. Rosewich, M. A. Rose, et S. Zielen. 2006. « Impaired Interferon- γ Production in Response to Live Bacteria and Toll-like Receptor Agonists in Patients with Ataxia Telangiectasia ». *Clinical and Experimental Immunology* 146 (3): 381–389. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03221.x>.
- Reichenbach, Janine, Ralf Schubert, Detlef Schindler, Klaus Müller, Hansjosef Böhles, et Stefan Zielen. 2002. « Elevated Oxidative Stress in Patients with Ataxia Telangiectasia ». *Antioxidants & Redox Signaling* 4 (3): 465-69. <https://doi.org/10.1089/15230860260196254>.

- Robbiani, Davide F., Stephanie Deroubaix, Niklas Feldhahn, Thiago Y. Oliveira, Elsa Callen, Qiao Wang, Mila Jankovic, et al. « Plasmodium Infection Promotes Genomic Instability and AID-Dependent B Cell Lymphoma ». *Cell* 162, n° 4 (13 août 2015): 727-37. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.019>.
- Robertson, E. S., J. Lin, et E. Kieff. 1996. « The Amino-Terminal Domains of Epstein-Barr Virus Nuclear Proteins 3A, 3B, and 3C Interact with RBPJ(Kappa) ». *Journal of Virology* 70 (5): 3068–3074.
- Rongvaux, Anthony, Hitoshi Takizawa, Till Strowig, Tim Willinger, Elizabeth E. Eynon, Richard A. Flavell, et Markus G. Manz. 2013. « Human Hemato-Lymphoid System Mice: Current Use and Future Potential for Medicine ». *Annual Review of Immunology* 31: 635–674. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095921>.
- Roos, Wynand P., et Bernd Kaina. 2006. « DNA Damage-Induced Cell Death by Apoptosis ». *Trends in Molecular Medicine* 12 (9): 440–450. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.007>.
- Rowe, M., A. L. Lear, D. Croom-Carter, A. H. Davies, et A. B. Rickinson. 1992. « Three Pathways of Epstein-Barr Virus Gene Activation from EBNA1-Positive Latency in B Lymphocytes ». *Journal of Virology* 66 (1): 122–131.
- Saha, Abhik, Adebowale Bamidele, Masanao Murakami, et Erle S. Robertson. 2011a. « EBNA3C Attenuates the Function of p53 through Interaction with Inhibitor of Growth Family Proteins 4 and 5 ». *Journal of Virology* 85 (5): 2079–2088. <https://doi.org/10.1128/JVI.02279-10>.
- Scheinfeldt, Laura B., Kelly Hodges, Jonathan Pevsner, Dorit Berlin, Nahid Turan, et Norman P. Gerry. 2018. « Genetic and Genomic Stability across Lymphoblastoid Cell Line Expansions ». *BMC Research Notes* 11 (1): 558. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3664-3>.
- Schrader, Michael, Joseph Costello, Luis F. Godinho, et Markus Islinger. 2015. « Peroxisome-Mitochondria Interplay and Disease ». *Journal of Inherited Metabolic Disease* 38 (4): 681–702. <https://doi.org/10.1007/s10545-015-9819-7>.
- Shanbhag, Niraj M., Ilona U. Rafalska-Metcalf, Carlo Balane-Bolivar, Susan M. Janicki, et Roger A. Greenberg. 2010. « ATM-Dependent Chromatin Changes Silence Transcription in Cis to DNA Double-Strand Breaks ». *Cell* 141 (6): 970-81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.038>.

- Shav-Tal, Yaron, Janna Blechman, Xavier Darzacq, Cristina Montagna, Billy T. Dye, James G. Patton, Robert H. Singer, et Dov Zipori. 2005. « Dynamic Sorting of Nuclear Components into Distinct Nucleolar Caps during Transcriptional Inhibition ». *Molecular Biology of the Cell* 16 (5): 2395-2413.
<https://doi.org/10.1091/mbc.e04-11-0992>.
- Shigeta, T., M. Takagi, D. Delia, L. Chessa, S. Iwata, Y. Kanke, M. Asada, M. Eguchi, et S. Mizutani. 1999. « Defective Control of Apoptosis and Mitotic Spindle Checkpoint in Heterozygous Carriers of ATM Mutations ». *Cancer Research* 59 (11): 2602-7.
- Shiloh, Yosef. 2003. « ATM and Related Protein Kinases: Safeguarding Genome Integrity ». *Nature Reviews. Cancer* 3 (3): 155–168. <https://doi.org/10.1038/nrc1011>.
- Shiloh, Yosef, et Yael Ziv. 2013. « The ATM Protein Kinase: Regulating the Cellular Response to Genotoxic Stress, and More ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (4): 197-210.
- Siliciano, J. D., C. E. Canman, Y. Taya, K. Sakaguchi, E. Appella, et M. B. Kastan. 1997. « DNA Damage Induces Phosphorylation of the Amino Terminus of p53 ». *Genes & Development* 11 (24): 3471–3481.
- Singh, V. V., D. Dutta, M. A. Ansari, S. Dutta, B. Chandran, et R. Longnecker. 2014. « Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Induces the ATM and H2AX DNA Damage Response Early during De Novo Infection of Primary Endothelial Cells, Which Play Roles in Latency Establishment ». *Journal of Virology* 88 (5): 2821–2834. <https://doi.org/10.1128/JVI.03126-13>.
- Skalska, Lenka, Robert E. White, Melanie Franz, Michaela Ruhmann, et Martin J. Allday. 2010. « Epigenetic Repression of P16(INK4A) by Latent Epstein-Barr Virus Requires the Interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP ». *PLoS Pathogens* 6 (6): e1000951.
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000951>.
- Smith, G. C., F. d'Adda di Fagagna, N. D. Lakin, et S. P. Jackson. 1999. « Cleavage and Inactivation of ATM during Apoptosis ». *Molecular and Cellular Biology* 19 (9): 6076–6084.
- Smith, Scott Carl, et Michal Hetman. 2011. « ATM is a Novel Regulator of Nucleolar Transcription ». *The FASEB Journal* 25 (1_supplement): lb34-lb34. https://doi.org/10.1096/fasebj.25.1_supplement.lb34.

- So, E Y, et T Ouchi. 2014a. « Translational initiation regulated by ATM in dendritic cells development ». *Cell Death & Disease* 5 (9): e1418. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.362>.
- So, E. Y., et T. Ouchi. 2014b. « Translational Initiation Regulated by ATM in Dendritic Cells Development ». *Cell Death & Disease* 5 (septembre): e1418. <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.362>.
- Spector, BD, AH Filipovich, GS Perry, et JH Kersey. 1982. « Epidemiology of cancer in ataxia telangiectasia. In: Bridges BA, Harnden DG, eds. Ataxia telangiectasia—a cellular and molecular link between cancer, neuropathology and immune deficiency. » *Chichester: J. Wiley and Sons*, 103–138.
- Stagni, Venturina, Maria Giovanna di Bari, Silvia Cursi, Ivano Condò, Maria Teresa Cencioni, Roberto Testi, Yaniv Lerenthal, Enrico Cundari, et Daniela Barilà. 2008. « ATM Kinase Activity Modulates Fas Sensitivity through the Regulation of FLIP in Lymphoid Cells ». *Blood* 111 (2): 829–837. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-04-085399>.
- Stanley, Fintan K. T., Shaun Moore, et Aaron A. Goodarzi. 2013. « CHD Chromatin Remodelling Enzymes and the DNA Damage Response ». *Mutation Research* 750 (1-2): 31–44. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.07.008>.
- Staples, E. R., E. M. McDermott, A. Reiman, P. J. Byrd, S. Ritchie, A. M. R. Taylor, et E. G. Davies. 2008. « Immunodeficiency in Ataxia Telangiectasia Is Correlated Strongly with the Presence of Two Null Mutations in the Ataxia Telangiectasia Mutated Gene ». *Clinical and Experimental Immunology* 153 (2): 214–220. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2008.03684.x>.
- Stechow, Louise von, Dimitris Typas, Jordi Carreras Puigvert, Laurens Oort, Ramakrishnaiah Siddappa, Alex Pines, Harry Vrieling, Bob van de Water, Leon H. F. Mullenders, et Erik H. J. Danen. 2015. « The E3 Ubiquitin Ligase ARIH1 Protects against Genotoxic Stress by Initiating a 4EHP-Mediated mRNA Translation Arrest ». *Molecular and Cellular Biology* 35 (7): 1254–68. <https://doi.org/10.1128/MCB.01152-14>.
- Stoppa-Lyonnet, Dominique, Jean Soulier, Anthony Lauge, et Marc-Henri Stern. s. d. « Inactivation of the ATM Gene in T-Cell Prolymphocytic Leukemias », 8.

- Strowig, Till, Cagan Gurer, Alexander Ploss, Yi-Fang Liu, Frida Arrey, Junji Sashihara, Gloria Koo, et al. 2009. « Priming of Protective T Cell Responses against Virus-Induced Tumors in Mice with Human Immune System Components ». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (6): 1423–1434.
<https://doi.org/10.1084/jem.20081720>.
- Suarez, F. 2006. « Infection-Associated Lymphomas Derived from Marginal Zone B Cells: A Model of Antigen-Driven Lymphoproliferation ». *Blood* 107 (8): 3034-44. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3679>.
- Suarez, Felipe, Nizar Mahlaoui, Danielle Canoni, Chantal Andriamanga, Catherine Dubois d’Enghien, Nicole Brousse, Jean-Philippe Jais, Alain Fischer, Olivier Hermine, et Dominique Stoppa-Lyonnet. 2015. « Incidence, Presentation, and Prognosis of Malignancies in Ataxia-Telangiectasia: A Report from the French National Registry of Primary Immune Deficiencies ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 33 (2): 202-8.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2014.56.5101>.
- Sugden, B., et W. Mark. 1977. « Clonal Transformation of Adult Human Leukocytes by Epstein-Barr Virus ». *Journal of Virology* 23 (3): 503–508.
- Sun, Yingli, Xiaofeng Jiang, Shujuan Chen, Norvin Fernandes, et Brendan D. Price. 2005. « A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of ATM ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (37): 13182–13187.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0504211102>.
- Sun, Yingli, Ye Xu, Kanaklata Roy, et Brendan D. Price. 2007. « DNA Damage-Induced Acetylation of Lysine 3016 of ATM Activates ATM Kinase Activity ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (24): 8502–8509.
<https://doi.org/10.1128/MCB.01382-07>.
- Syllaba, L, et K Henner. 1926. « Contribution à l’étude de l’indépendance de l’athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. » *Revue neurologique*, 1: 541–560.

- Tabanelli, Valentina, Vanessa Santiago-Pacheco, Mario Corbellino, Angelica Calleri, Claudio Agostinelli, Carlo Parravicini, et Stefano A. Pileri. 2017. « Cytotoxic Epstein-Barr Virus-Positive Large B Cell Lymphoma: A Regulatory B Cell-Derived Neoplasia? » *Histopathology* 70 (4): 650-56.
<https://doi.org/10.1111/his.13109>.
- Takeda, Shunichi, Kyoko Nakamura, Yoshihito Taniguchi, et Tanya T. Paull. 2007. « Ctp1/CtIP and the MRN Complex Collaborate in the Initial Steps of Homologous Recombination ». *Molecular Cell* 28 (3): 351–352. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.10.016>.
- Tangye, Stuart G. 2014. « XLP: Clinical Features and Molecular Etiology Due to Mutations in SH2D1A Encoding SAP ». *Journal of Clinical Immunology* 34 (7): 772–779. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0083-7>.
- Tangye, Stuart G., et Kim L. Good. 2007. « Human IgM+CD27+ B Cells: Memory B Cells or “Memory” B Cells? » *The Journal of Immunology* 179 (1): 13-19. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.1.13>.
- Tangye, Stuart G., Umaimainthan Palendira, et Emily S. J. Edwards. 2017. « Human Immunity against EBV- Lessons from the Clinic ». *The Journal of Experimental Medicine* 214 (2): 269–283.
<https://doi.org/10.1084/jem.20161846>.
- Taylor, A M R, J A Metcalfe, et J Thick. s. d. « Leukemia and Lymphoma in Ataxia Telangiectasia », 17.
- Thorley-Lawson, David A. 2015. « EBV Persistence—Introducing the Virus ». In *Epstein Barr Virus Volume 1: One Herpes Virus: Many Diseases*, édité par Christian Münz, 151–209. Current Topics in Microbiology and Immunology. Cham: Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-22822-8_8.
- Thorley-Lawson, David A., et Martin J. Allday. 2008. « The Curious Case of the Tumour Virus: 50 Years of Burkitt’s Lymphoma ». *Nature Reviews Microbiology* 6 (12): 913–924.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2015>.
- Tierney, R., H. Kirby, J. Nagra, A. Rickinson, et A. Bell. 2000. « The Epstein-Barr Virus Promoter Initiating B-Cell Transformation Is Activated by RFX Proteins and the B-Cell-Specific Activator Protein BSAP/Pax5 ». *Journal of Virology* 74 (22): 10458–10467.

- Timens, W., A. Boes, H. Vos, et S. Poppema. 1991. « Tissue Distribution of the C3d/EBV-Receptor: CD21 Monoclonal Antibodies Reactive with a Variety of Epithelial Cells, Medullary Thymocytes, and Peripheral T-Cells ». *Histochemistry* 95 (6): 605–611.
- Toritsuka, Michihiro, Manabu Makinodan, Takahira Yamauchi, Yasunori Yamashita, Daisuke Ikawa, Takashi Komori, Sohei Kimoto, Kaori Hamano-Iwasa, Hideo Matsuzaki, et Toshifumi Kishimoto. 2018. « Altered Gene Expression in Lymphoblastoid Cell Lines after Subculture ». *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 54 (7): 523-27. <https://doi.org/10.1007/s11626-018-0267-1>.
- Tse, Eric, et Yok-Lam Kwong. 2015. « Epstein Barr Virus-Associated Lymphoproliferative Diseases: The Virus as a Therapeutic Target ». *Experimental & Molecular Medicine* 47 (janvier): e136. <https://doi.org/10.1038/emm.2014.102>.
- Tse, Ka-Po, Wen-Hui Su, Kai-Ping Chang, Ngan-Ming Tsang, Chia-Jung Yu, Petrus Tang, Lee-Chu See, et al. 2009. « Genome-Wide Association Study Reveals Multiple Nasopharyngeal Carcinoma-Associated Loci within the HLA Region at Chromosome 6p21.3 ». *American Journal of Human Genetics* 85 (2): 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.07.007>.
- Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, et H. Kikutani. 1999. « Mimicry of CD40 Signals by Epstein-Barr Virus LMP1 in B Lymphocyte Responses ». *Science (New York, N.Y.)* 286 (5438): 300–303.
- Urayama, Kevin Y., Ruth F. Jarrett, Henrik Hjalgrim, Arjan Diepstra, Yoichiro Kamatani, Amelie Chabrier, Valerie Gaborieau, et al. « Genome-Wide Association Study of Classical Hodgkin Lymphoma and Epstein-Barr Virus Status-Defined Subgroups ». *Journal of the National Cancer Institute* 104, n° 3 (8 février 2012): 240-53. <https://doi.org/10.1093/jnci/djr516>.
- Uziel, T., K. Savitsky, M. Platzner, Y. Ziv, T. Helbitz, M. Nehls, T. Boehm, A. Rosenthal, Y. Shiloh, et G. Rotman. 1996. « Genomic Organization of the ATM Gene ». *Genomics* 33 (2): 317–320. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0201>.

- Valentin-Vega, Yasmine A., Kirsteen H. Maclean, Jacqueline Tait-Mulder, Sandra Milasta, Meredith Steeves, Frank C. Dorsey, John L. Cleveland, Douglas R. Green, et Michael B. Kastan. 2012. « Mitochondrial Dysfunction in Ataxia-Telangiectasia ». *Blood* 119 (6): 1490–1500. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-08-373639>.
- Vantourout, Pierre, et Adrian Hayday. 2013. « Six-of-the-Best: Unique Contributions of $\Gamma\delta$ T Cells to Immunology ». *Nature Reviews. Immunology* 13 (2): 88–100. <https://doi.org/10.1038/nri3384>.
- Woisetschlaeger, M., C. N. Yandava, L. A. Furmanski, J. L. Strominger, et S. H. Speck. 1990. « Promoter Switching in Epstein-Barr Virus during the Initial Stages of Infection of B Lymphocytes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (5): 1725–1729.
- Woods, C. G., S. E. Bunday, et A. M. Taylor. 1990. « Unusual Features in the Inheritance of Ataxia Telangiectasia ». *Human Genetics* 84 (6): 555–562.
- Wu, Liang, Barbro Ehlin-Henriksson, Xiaoying Zhou, Hong Zhu, Ingemar Ernberg, Lorand L. Kis, et George Klein. 2017. « Epstein-Barr Virus (EBV) Provides Survival Factors to EBV+ Diffuse Large B-Cell Lymphoma (DLBCL) Lines and Modulates Cytokine Induced Specific Chemotaxis in EBV+ DLBCL ». *Immunology* 152 (4): 562-73. <https://doi.org/10.1111/imm.12792>.
- Xiang, Zheng, Yinping Liu, Jian Zheng, Ming Liu, Aizhen Lv, Yulong Gao, Huaidong Hu, et al. 2014. « Targeted Activation of Human $V\gamma 9V\delta 2$ -T Cells Controls Epstein-Barr Virus-Induced B Cell Lymphoproliferative Disease ». *Cancer Cell* 26 (4): 565-76. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.026>.
- Xu, Guorong, Michael J. Strong, Michelle R. Lacey, Carl Baribault, Erik K. Flemington, et Christopher M. Taylor. 2014. « RNA CoMPASS: A Dual Approach for Pathogen and Host Transcriptome Analysis of RNA-Seq Datasets ». *PLOS ONE* 9 (2): e89445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089445>.
- Xu, Naihan, Yuanzhi Lao, Yaou Zhang, et David A. Gillespie. 2012. « Akt: A Double-Edged Sword in Cell Proliferation and Genome Stability ». *Journal of Oncology* 2012: 951724. <https://doi.org/10.1155/2012/951724>.

- Yamamoto, Takenobu, Mir A. Ali, XueQiao Liu, et Jeffrey I. Cohen. 2014. « Activation of H2AX and ATM in Varicella-Zoster Virus (VZV)-Infected Cells Is Associated with Expression of Specific VZV Genes ». *Virology* 452-453 (mars): 52–58. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.12.039>.
- Yang, D. Q., et M. B. Kastan. 2000. « Participation of ATM in Insulin Signalling through Phosphorylation of EIF-4E-Binding Protein 1 ». *Nature Cell Biology* 2 (12): 893-98. <https://doi.org/10.1038/35046542>.
- Young, Lawrence S., et Alan B. Rickinson. 2004. « Epstein-Barr Virus: 40 Years On ». *Nature Reviews. Cancer* 4 (10): 757-68. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>.
- Yuling, He, Xiao Ruijing, Li Li, Ji Xiang, Zhou Rui, Wang Yujuan, Zhang Lijun, et al. 2009. « EBV-Induced Human CD8+ NKT Cells Suppress Tumorigenesis by EBV-Associated Malignancies ». *Cancer Research* 69 (20): 7935–7944. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0828>.
- Zhang, Liwen, Dennis A. Simpson, Cynthia L. Innes, Jeff Chou, Pierre R. Bushel, Richard S. Paules, William K. Kaufmann, et Tong Zhou. 2013. « Gene Expression Signatures but Not Cell Cycle Checkpoint Functions Distinguish AT Carriers from Normal Individuals ». *Physiological Genomics* 45 (19): 907-16. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00064.2013>.
- Zimber-Strobl, U., L. J. Strobl, C. Meitinger, R. Hinrichs, T. Sakai, T. Furukawa, T. Honjo, et G. W. Bornkamm. 1994. « Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen 2 Exerts Its Transactivating Function through Interaction with Recombination Signal Binding Protein RBP-J Kappa, the Homologue of Drosophila Suppressor of Hairless ». *The EMBO Journal* 13 (20): 4973–4982.
- Ziv, Yael, Dana Bielopolski, Yaron Galanty, Claudia Lukas, Yoichi Taya, David C. Schultz, Jiri Lukas, Simon Bekker-Jensen, Jiri Bartek, et Yosef Shiloh. 2006. « Chromatin Relaxation in Response to DNA Double-Strand Breaks Is Modulated by a Novel ATM- and KAP-1 Dependent Pathway ». *Nature Cell Biology* 8 (8): 870–876. <https://doi.org/10.1038/ncb1446>.
- Zuo, Lielian, Haibo Yu, Lingzhi Liu, Yunlian Tang, Hongzhuan Wu, Jing Yang, Meijuan Zhu, et al. 2015. « The Copy Number of Epstein-Barr Virus Latent Genome Correlates with the Oncogenicity by the Activation Level of LMP1 and NF-KB ». *Oncotarget* 6 (38): 41033-44. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5708>.

VI. ANNEXE

REVIEW PUBLIEE A PARTIR DE L'INTRODUCTION DE CETTE THESE



Epstein-Barr Virus (EBV)-Related Lymphoproliferative Disorders in Ataxia Telangiectasia: Does ATM Regulate EBV Life Cycle?

Moussab Tatfi, Olivier Hermine and Felipe Suarez*

INSERM U1163/CNRS ERL8254 - Laboratory of cellular and molecular mechanisms of hematological disorders and therapeutic implications, IMAGINE Institute, Paris, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Fabian Hauck,
LMU München, Germany

Reviewed by:

Henri-Jacques Delecluse,
German Cancer Research Center
(DKFZ), Germany
Claire Booth,
Great Ormond Street Institute of Child
Health, University College London,
United Kingdom
Christoph Walz,
Ludwig Maximilian University of
Munich, Germany

*Correspondence:

Felipe Suarez
felipe.suarez@aphp.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Primary Immunodeficiencies,
a section of the journal
Frontiers in Immunology

Received: 21 September 2018

Accepted: 10 December 2018

Published: 04 January 2019

Citation:

Tatfi M, Hermine O and Suarez F
(2019) Epstein-Barr Virus
(EBV)-Related Lymphoproliferative
Disorders in Ataxia Telangiectasia:
Does ATM Regulate EBV Life Cycle?
Front. Immunol. 9:3060.
doi: 10.3389/fimmu.2018.03060

Epstein-Barr virus (EBV) is an ubiquitous herpesvirus with a tropism for epithelial cells (where lytic replication occurs) and B-cells (where latency is maintained). EBV persists throughout life and chronic infection is asymptomatic in most individuals. However, immunocompromised patients may be unable to control EBV infection and are at increased risk of EBV-related malignancies, such as diffuse large B-cell lymphomas or Hodgkin's lymphomas. Ataxia telangiectasia (AT) is a primary immunodeficiency caused by mutations in the *ATM* gene and associated with an increased incidence of cancers, particularly EBV-associated lymphomas. However, the immune deficiency present in AT patients is often too modest to explain the increased incidence of EBV-related malignancies. The *ATM* defect in these patients could therefore impair the normal regulation of EBV latency in B-cells, thus promoting lymphomagenesis. This suggests that *ATM* plays a role in the normal regulation of EBV latency. *ATM* is a serine/threonine kinase involved in multiple cell functions such as DNA damage repair, cell cycle regulation, oxidative stress, and gene expression. *ATM* is implicated in the lytic cycle of EBV, where EBV uses the activation of DNA damage repair pathway to promote its own replication. *ATM* regulates the latent cycle of the EBV-related herpesvirus KSHV and MHV68. However, the contribution of *ATM* in the control of the latent cycle of EBV is not yet known. A better understanding of the regulation of EBV latency could be harnessed in the conception of novel therapeutic strategies in AT and more generally in all *ATM* deficient EBV-related malignancies.

Keywords: ataxia telangiectasia, Epstein Barr virus, latency, B-cell, primary immune deficiency, lymphomagenesis, hodgkin lymphoma, non-hodgkin lymphoma

INTRODUCTION

Epstein-Barr virus (EBV) is a γ -herpesvirus that infects 95% of adults worldwide. EBV targets epithelial cells where lytic replication occurs, and B-cells where latent infection is established. The distinct phases of EBV infection are carefully controlled throughout the infected host's life, and chronic infection in immunocompetent individuals is mostly asymptomatic (1). Control of chronic EBV infection in immunocompromised patients may fail, leading to lymphoproliferative disorders as well as *bona fide* lymphomas (hereafter referred to as EBV-LPD) (2).

Several primary immune deficiencies (PID) are associated with poor responses to EBV and are also associated with a high risk of EBV-LPD (3). Inherited genetic abnormalities causing PID are often associated with poor or absent EBV-specific cytotoxic T-cell response and studies on PID and their underlying molecular mechanisms have led to a better understanding of immunological and cellular processes that control herpesvirus infection.

EBV infects B-cells both *in vivo* and *in vitro* and can lead to their immortalization. EBV latent genes drive the activation and differentiation of B-cells (4). Deregulation of this complex and dynamic interaction of viral gene expression and cellular activation may lead to cell transformation.

Ataxia telangiectasia (AT) is a rare PID caused by mutations in the *ATM* gene. AT patients are at increased risk of cancer, including EBV-LPD (5). However, the extent of immune compromise in AT is variable, and many patients have only minor immunological alterations (6). *ATM* is involved in many functions ranging from DNA repair to gene expression. Based on the paradoxical observation that EBV-LPD frequency is increased in *ATM* patients while they do not exhibit major T-cell deficiency, we raise the hypothesis that the defect of *ATM* in EBV-infected cells could play a role *per se* in the control of EBV latency, favoring a latent program more prone to lymphomagenesis. We review here the characteristics of AT and discuss the immunological and cellular abnormalities that may confer susceptibility to EBV-related malignancies.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL FEATURES OF AT

AT is an autosomal recessive disorder caused by biallelic mutations in the *Ataxia-telangiectasia mutated (ATM)* gene. Its estimated incidence is about 1/300,000 live births (7). AT was first reported by Syllaba and Henner in 1926 (8), further characterized by Denise Louis-Bar (9), and finally named by Boder and Sedgwick (10).

AT is characterized by progressive neurodegeneration leading to ataxia, oculo-cutaneous telangiectasia, variable degrees of immune deficiency, and susceptibility to cancer. AT is clinically heterogeneous, the classic form starts typically around 4 years of age, most patients becoming wheelchair-bound by the age of 10. Milder forms of AT may appear later and develop slowly. AT patients have a reduced life expectancy with a median survival of 19 to 25 years (11, 12). Mortality is mostly due to respiratory tract infections and cancers (6).

AT patients have a variable immunodeficiency, rarely progressive, with some patients not affected at all. Complete loss of *ATM* kinase activity leads to a more severe immunologic phenotype. B-cell and T-cell lymphopenia may be present in ~70% of AT patients (6, 13). Over 60% of patients also have abnormal serum immunoglobulin levels, most notably a deficiency of IgG4 (65%), IgA (63%), and IgG2 (48%) (6).

GENETIC AND MOLECULAR BASIS OF AT

The *ATM* gene (~160kB) was cloned in 1995 (14). Over 400 mutations of *ATM* have been reported, spanning all 66 exons

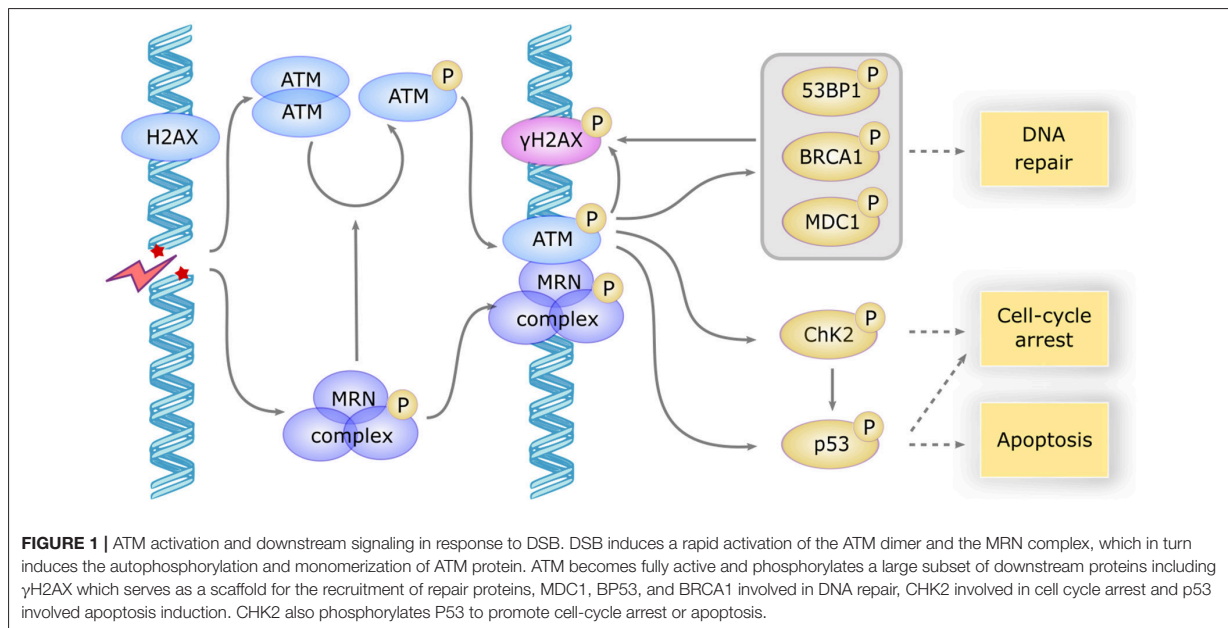
of the gene (Leiden Open Variation database). Most of these mutations lead to complete loss of *ATM* protein expression, but missense, and splice mutations can lead to the expression of a protein with residual kinase activity (15).

The *ATM* gene encodes a 350 kDa serine/threonine kinase belonging to the phosphatidylinositol 3-kinase-related kinase (PIKK) family (16). *ATM* is mostly located in the nucleus, but ~20% are found in the cytoplasm, mainly in peroxisomes, endosomes, and as soluble proteins (17). *ATM* is involved in many cellular functions, including cell cycle checkpoint, apoptosis, oxidative stress, mitochondrial metabolism, gene regulation, and telomeres maintenance, but one of its major roles is its involvement in double strand break (DSB) repair (18). DSB can occur by endogenous processes, during replication fork collapse, V-(D)-J recombination or class switching, and can be induced by exogenous factors such as chemotherapy. In the canonical pathway, *ATM* is partially activated few seconds after DSB, probably after the relaxation of chromatin adjacent to the break. The MRN complex (Mre11/Rad50/Nbs1) recognizes the site of DNA break and in turn recruits *ATM* (Figure 1). Autophosphorylation of the *ATM* dimer occurs after its association with the MRN complex and precedes the formation of the fully active monomer forms (17).

ATM then phosphorylates H2AX, a variant of the histone H2A family, forming γ H2AX foci that serve as a scaffold for the recruitment of DNA repair proteins such as MDC1, 53BP1, and BRCA1. Several other important partners are phosphorylated by *ATM*, such as Chk2 and p53, which initiate the downstream events of DNA repair and induce cell cycle arrest or apoptosis if DNA repair fails (18). The repair mechanism involves non-homologous end joining, an error-prone process occurring in G1/S phase (19), or homologous recombination, a faithful process in G2/M when sister chromatid is available (20).

As a result, defective DSB repair in AT patients elicit genomic instability that leads to B-cell and T-cell lymphopenia, premature senescence, and cancer. *ATM* plays a key role in the development of lymphocytes, allowing DSB repair occurring during B-cell, and T-cell differentiation. However, DSB repair may be possible via the alternative end-joining, an error prone, and poorly understood *ATM* independent pathway, which could explain the modest degree of lymphopenia in AT patients (21). Some lymphoid malignancies, such as mantle cell lymphoma, diffuse large B-cell lymphomas, and Hodgkin lymphomas, are also associated with acquired *ATM* mutations (22).

Patients with AT are at increased risk of cancer, especially lymphoid malignancies (23). To estimate precisely the risk of cancers in patients with AT, we conducted a retrospective study of cancers of 279 AT patients from the registry of the French National Reference Center for Primary Immune Deficiencies (CEREDIH) (5) and found that 25% of AT patients develop malignancies, the most common of which were aggressive non-Hodgkin's lymphomas (55% of all cancers), followed by Hodgkin's lymphoma (17%), leukemia (16%), and various solid tumors (12%). EBV was associated with 100% of Hodgkin's lymphomas and 50% of B-cell non-Hodgkin's lymphomas.



EPSTEIN-BARR VIRUS

EBV belongs to the *herpesviridae* family of large enveloped double-stranded DNA viruses, and was first identified in Burkitt's lymphoma in the 1960s (24). All herpesviruses have 2 distinct phases of infection, lytic, and latent. The lytic EBV infection occurs in oropharyngeal epithelial cells and leads to viral replication and production of multiple virions that spread into the underlying lymphoid tissues and infect naive B-cells (25). In the latter, EBV enters latency, a phase during which the viral genome is maintained as a nuclear episome, and only a few viral genes are transcribed (26).

Expression of the latency genes is tightly controlled by cellular and viral factors. Cellular immunity is also strongly induced during EBV infection and contributes to the elimination of infected cells expressing immunogenic lytic and latent antigens (27). Analysis of viral gene expression in EBV-associated cancers has led to a model in which EBV transitions through several latency gene expression programs (latency III, II, I) (28). Depending on the stage of latency, cells can express nuclear proteins (EBNA-1, -2, -3a, -3b, -3c, and -LP), latent membrane proteins (LMP-1, -2A, and -2B), non-coding RNAs (EBER-1 and -2), and several microRNAs (4). According to this model, EBV uses different latency programs to exploit B cell maturation pathways in the germinal center, leading the infected B-cell to the long-lived memory B-cell pool (28). The viral proteins LMP1 and LMP2 replicate the signals induced in B cells during the germinal center reaction and cause their proliferation. LMP1 mimics the signal of the activated CD40 (29) and induces EBV-LPD in transgenic mice (30), and LMP2 mimics the signal of the antigen activated B-cell receptor (31) and allow B-cell development even in the absence of normal B-cell receptor signaling (32).

EBV latency genes and non-coding RNAs may have oncogenic properties or interfere with cellular activation pathways leading to proliferation of B-cells as immunoblasts (33). Indeed, *in vitro* EBV infection of naive B-cells leads to immortalized and fully transformed lymphoblastoid cell lines in latency III that can induce tumors in nude mice (34). During latency III, EBNA-2 interacts with the target of the Notch pathway RBP-J κ (35) and recruits co-activators, allowing the transcription of many genes involved in proliferation including *MYC* (36). EBNA-2 also promotes the transcription of all other latency genes, including the EBNA-3 family which gradually replaces EBNA-2 in its association with RBP-J κ (37). The EBNA-3 family recruits co-repressors and inhibits the transcription of EBNA-2 induced genes. Indeed, prolonged expression of *MYC* could induce early senescence and be harmful to the virus (38). Infected B-cells migrate to the germinal center and progressively lose the expression of EBNA-2 and EBNA-3, escaping the immune control (latency II). During their transit through the germinal center to finally reach the memory B-cell pool, infected B-cells further restrict the expression of latency genes to express only EBNA1, a viral protein involved in the tethering of the viral episome to the nuclear chromatin (latency I) (39). EBV persists then indefinitely in memory B-cells (40). When these infected cells differentiate into plasma cell following an encounter with their cognate antigen, the transcription factor XBP-1 induced during plasma cell differentiation activates the expression of BZLF1, a viral protein sufficient to induce the lytic cycle (41). Virions are then released into the bloodstream and can re-infect the oropharynx epithelium to perpetuate the infectious cycle.

Occasional lytic replication occurs in the oropharynx of healthy individuals, and evidence shows that the majority of these cells do not complete the full lytic cycle despite BZLF1

expression (42–44). Abortive cycles have also been described in EBV-LPD such as Burkitt lymphomas (45), or diffuse large B-cell lymphomas (46). Several BZLF1-induced viral genes have anti-apoptotic or immunomodulatory properties, allowing the lytic cell to avoid cell-death (47). These genes are also activated during the abortive cycle and growing evidences suggests that these genes may contribute to lymphomagenesis. Indeed, the rate of EBV-LPD induced by EBV infection of humanized mice is severely reduced when BZLF1-deficient virus is used (48).

MECHANISMS UNDERLYING AT SUSCEPTIBILITY TO EBV

AT Immune Dysfunction

Cytotoxic T-cells (CTL) play a major role in controlling the expansion of EBV infected B-cells. Primary EBV infection in young adults leads to infectious mononucleosis associated with a massive CTL expansion (49). The viral EBNA-3 proteins and, to a lesser extent, EBNA-2 induce a potent CTL response (27), which eliminates most infected cells.

Thymic hypoplasia has been described in AT (13), and may be the cause of the various degree of T-cell lymphopenia, especially of the naïve T-cell population (CD3+ CD4+ CD45RA+ and CD3+ CD8+ CD45RA+), found in these patients (50). Similarly, TCR excision circles (TREC) as a measure of thymic output, can be useful for early diagnosis of AT (51). The naïve T-cell defect may also contribute to the described defect in IFN γ (52) which is important for defense against viruses and bacteria, and immunosurveillance of cancers.

However, severe viral or opportunistic infections are not frequent (6) and most AT patients seem to have an intact T-cell response (53, 54). The vaccine response is also functional, with a totally normal response for some patients and a reduced response for others (6).

Nonetheless, AT patients have recurrent sinopulmonary bacterial infections that seems to increase with age (55). This could be explained by the IgA deficiency associated with an increased risk of chronic rhinosinusitis (56), the IFN γ production deficiency (52), but also by the progressive neurodegeneration; AT patients may have mastication and swallowing difficulties that worsen with age leading to an unintentional inhalation of food (6, 57).

Several observations suggest that $\gamma\delta$ T-cells play a role in the control of viral infections. $\gamma\delta$ T-cells represent 1–10% of the total T-cells and recognize a distinct range of antigenic targets (58). Infusion of pamidronate (known to activate $\gamma\delta$ T-cells) in humanized mice significantly reduced EBV-LPD. AT patients seem to have an increase in the $\gamma\delta$ T-cell population (59).

A humoral response is also generated but plays a limited role in the control of EBV infection (60). The NK-cells response is also important in the control of primary infection (61) but the number of NK-cells and their function in AT patients seems normal (62), despite an expansion of the CD56 bright population (CD3- CD16+ CD56+). This population is important for cytokines production but is not sufficient to overcome the IFN γ production defect (52). In summary, these immunological defects

in AT patients do not seem sufficient to explain the increased incidence of EBV-LPD.

Some studies have also suggested a role for invariant NK-T cells (iNKT) in EBV control. These cells are restricted by CD1d, a class I MHC-like molecule exposing lipid antigens. Patients with mutations in *SH2D1A* (encoding SAP) or in *BIRC4* (encoding XIAP) have little or no iNKT and are very sensitive to EBV. However, these mutations also affect normal T-cells function, making it unclear if the iNKT defect is responsible for the disease (63, 64). Infused iNKT in immunodeficient mice injected with EBV transformed cells show reduced tumor formation (65). Similarly, a study on EBV-infected peripheral blood mononuclear cells *in vitro* showed higher transformation efficiency when iNKT were previously depleted (66). There has been to date no full exploration of iNKT levels in AT patients, but a small study of 3 patients suggests that AT patients do have iNKT deficiency (67).

While most PID patients with EBV sensitivity have an anti-EBV CTL defect, other PID patients have a specific EBV sensitivity by other mechanisms, such as XMEN (mutations in *MAGT1*) (68), or patients with mutations in *CTPS1* (69). *MAGT1* allows a TCR-induced influx of magnesium that activates T-cells (70) and *CTPS1* allows CTP synthesis involved in nucleic acids anabolism (69). T-cells from these patients can respond to a standard stimulation of the immune system, but the ability of their T-cells to cope with the overwhelming proliferative stress induced by EBV infection is severely impaired, leading to an EBV specific immune deficiency.

Evidence for a Role of ATM During EBV Infection

As mentioned above there is evidence pointing to an abnormal control of EBV infection in AT patients without unequivocal evidence for an associated cellular immune defect leading to EBV-LPD. In the face of this apparent paradox, a cell intrinsic defect leading to impaired control of EBV latency in B-cells from AT patients, thereby promoting the oncogenic properties of the virus, may be hypothesized. There is indeed some evidence demonstrating the implication of ATM in the lytic and latent cycle of EBV as discussed below.

During the Lytic Cycle

ATM operates in the regulation of the lytic cycle of many viruses including EBV. During this cycle, viral replication generates a large amount of double-stranded linear DNA in the nucleus that are recognized as double strand breaks and thus activate the repair machinery (71). ATM and the MRN complex have been shown to bind the viral genome and recruit other proteins such as RPA, RAD51, and RAD52 that promote replication of the virus. Recent studies have reported inhibition of viral replication after pharmacological inhibition of ATM (72). BGLF4, one of the first viral proteins expressed during the lytic cycle, directly phosphorylates ATM, and H2AX (73). BGLF4 also phosphorylates and activates TIP60 (74), a histone acetyltransferase, which in turn activates ATM (75) (Figure 2A).

During lytic replication, ATM activation allows the phosphorylation of P53 and SP1, a transcription factor involved in DNA repair (76). SP1 plays a role in the formation of the

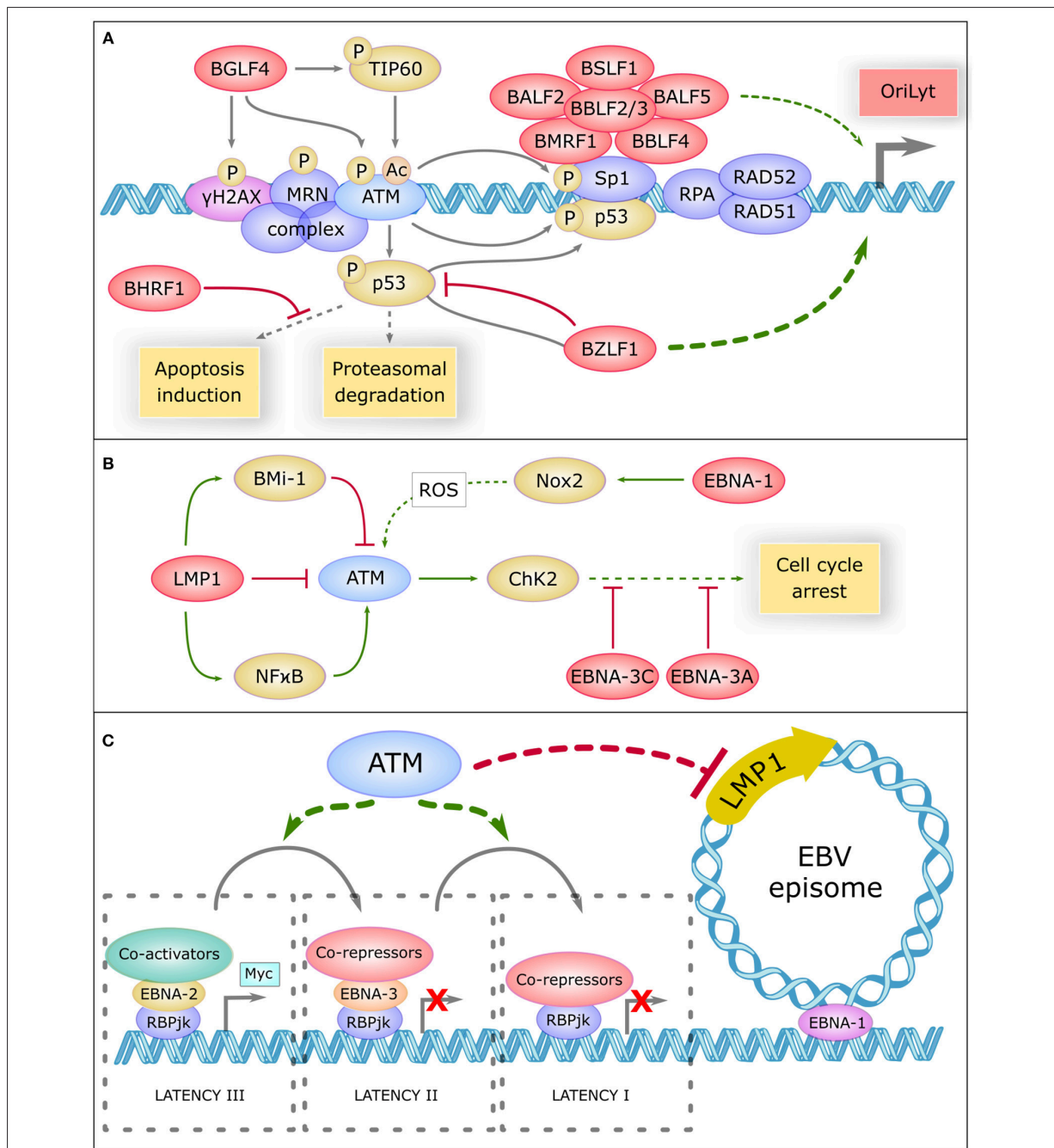


FIGURE 2 | Role Of Atm In Ebv Life Cycle Regulation **(A)** The central role of ATM in the replication compartment of EBV. In the lytic cycle, DNA damage response proteins such as γ H2AX, the MRN complex, ATM, SP1, RPA, RAD51, and RAD52 bind the viral genome and promote replication of the virus. Viral proteins are shown in red. BGLF4 phosphorylates H2AX, ATM, and TIP60 which acetylate ATM to promote this replication. ATM phosphorylates and activates Sp1 which is necessary to the formation of the replication compartment comprising a large complex of six core viral replication proteins (BSLF1, BALF2, BBLF2/3, BALF5, BMRF1, and BBLF4). ATM phosphorylates and activates P53, which is inhibited and driven by BZLF1 to the replication compartment. BZLF1 is a major transactivator of the lytic genes promoter OriLyt. P53 binds to Sp1 and promote the activation of OriLyt. P53 is regulated by proteasomal degradation and can induce apoptosis, but BHRF1 inhibits a panel of pro-apoptotic proteins. **(B)** ATM is regulated by EBV during latency. In the latent cycle, LMP1 downregulates ATM, and upregulates Bmi-1 which also (Continued)

FIGURE 2 | downregulates ATM. On the other hand, LMP1 activates the NF κ B pathway which activates ATM. EBNA-1 upregulates NOX2, which generates reactive oxygen species (ROS) that could activate ATM. Once activated, ATM activates CHK2 which promotes cell cycle arrest. However, EBNA-3C and EBNA-3A inhibit many proteins involved in cell cycle control. **(C)** Potential involvement of ATM in the regulation of EBV latency. ATM could be involved in inhibiting the expression of certain viral oncogenes, such as the main viral oncogene LMP1. ATM could also favor the progressive restriction of EBV latency, from type III latency to type I. In type III latency, EBNA-2 interacts with the target of the Notch pathway RBP-JK, recruits coactivators and induces the transcription of pro-proliferative genes like Myc. In type II latency, EBNA-3 replaces EBNA-2, and recruits co-repressors, thus preventing prolonged expression of MYC. In type I latency, RBP-JK is associated with corepressors and only EBNA-1 remains expressed, which allows the attachment of EBV episome on cellular chromosomes.

nuclear replication compartment of the virus (72) where a high level of P53 is found. SP1 and P53 form a complex which binds and activates BZLF1 promoter (71), the major viral transactivator of the EBV lytic genes. Other repair proteins present in these compartments such as RPA, RAD51, and RAD52 also appear to be involved in the induction of BZLF1 because their knockdown greatly reduces viral replication (77). In addition, the activity of CyclinA/CDK2 and cyclinE/CDK2 complexes appears enhanced in this context, leading to a prolonged pseudo-S phase environment that promotes replication of the viral DNA (71).

EBV uses ATM activation to facilitate its own replication. But long-lasting activated ATM may promote P53 accumulation and apoptosis induction. During the lytic cycle, the level of P53 is constant despite recurrent activation of the DNA repair pathway, and appears to be regulated by proteasomal degradation (71). In addition, BZLF1 associates with P53, inhibits its transactivating activity and drives it to the EBV replication compartment (71), which greatly limits the ability of P53 to activate pro-apoptotic genes. Even in that case, BHRF1, a viral analog of the BCL-2 protein expressed early during the lytic cycle, inhibits a large panel of pro-apoptotic proteins such as BIM, BID, BAK, or PUMA (78).

During Latency

ATM is also involved in the early steps of EBV latency establishment where it plays a tumor suppressor role. *In vitro*, the early hyperproliferation period of infected B cells is associated with ATM activation, leading to the death of the majority of cells (79). A total of about 3% of infected B-cells survive and become indefinitely proliferating lymphoblasts (80). Some EBV latency proteins have been shown to interact with ATM as well as with other DNA damage related proteins, but the overall implication of ATM in the latent cycle remains to be explored.

LMP1 upregulate BMI-1 in Hodgkin's lymphomas, a Polycomb related protein, and both proteins combine their effects to downregulate ATM expression (81). Similarly, EBV infection of the EBV negative BJAB line showed a defective DNA damage response (82). In addition, biopsies of patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma (NPC) revealed downregulation of ATM protein levels (83). On the other hand, it has been reported that LMP1 positively regulates ATM in NPC by activating NF- κ B pathway (84). This divergence in the effect of LMP1 on ATM expression is unclear and may be due to different LMP1 expression levels or to the use of different cell line types (Figure 2B).

EBNA1 upregulates the catalytic subunit of Nox2 in the NADPH oxidase complex, inducing the production of reactive oxygen species that could activate ATM (82). The

EBV-infected BJAB cells expressing EBNA1 also show more chromosomal aberrations (82). EBNA3C, a viral protein essential for transformation, has been shown to attenuate DNA damage response pathways in the early steps of transformation. It also inhibits the activity of many proteins involved in cell cycle control, such as P14, P16, P27, CHK2, P53, BUBR1 (85–90). EBNA3A appears to collaborate with EBNA3C in the inhibition of P14 and P16 (85).

There is also evidence pointing to a role of ATM in the regulation of latency of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) and Murine γ -herpesvirus 68 (MHV68), two herpesviruses closely related to EBV. During KSHV latency, there is a steady phosphorylation of a small amount of ATM and γ H2AX, which play a role in LANA-1 transactivation, the major latency protein (91). During MHV68 latency, ATM plays a role in the transactivation of the LANA-1 analog protein ORF73. Inactivation of ATM significantly reduces the expression of LANA-1 (91) and ORF73 (92), respectively, demonstrating the importance of ATM in the control of KSHV and MHV68 latency.

DISCUSSION

The increased incidence of malignancies in AT has primarily been linked to the genetic instability caused by DNA repair abnormalities. The high rate of association of B-cell malignancies with EBV may be interpreted as the consequence of AT associated immunodeficiency. Most patients however do not present opportunistic infections, indicating the absence of profound cellular immune deficiency. Although data are scarce, AT patients appear to have iNKT deficiency which may participate to the lack of control of viral infections. The contribution of iNKT deficiency in the propensity of AT patients to develop EBV-LPD requires further study.

Beside immune deficiency, ATM could also contribute to AT-associated EBV-related lymphoid malignancies by interfering with the B-cell intrinsic regulation of EBV persistence. ATM is known to play a role during the lytic cycle of EBV by creating the replication compartment of the virus and by promoting its replication. During latency, several viral proteins appear to interfere with ATM expression or with its downstream signaling. However, the effect of ATM on the regulation of viral latency is not yet known. The fact that ATM plays a role in the regulation of latency proteins of EBV-related herpesvirus, such as KSHV or MHV68, suggests that ATM may also be involved in the control of EBV latency.

Recent studies have shown an involvement of ATM in the inhibition of gene expression. Indeed, ATM activation in the vicinity of the DSB promotes the ubiquitination of nearby

H2A histones. This prevents the progress of polymerase II and thus inhibits the transcription of nearby genes (93). In the case of DSB within the nucleolus, ATM allows the blocking of polymerase I and its release of the nucleolus (94). ATM could conceptually also inhibit the transcription of some viral genes, such as the main EBV oncogene LMP1. ATM deficiency in AT patients could therefore release this inhibition, contributing to lymphomagenesis (Figure 2C). ATM could also participate in the restriction of EBV latency by promoting the transition from type III to type II latency and/or from type II to type I latency. The large number of EBV-associated Hodgkin's lymphomas, described as being derived from type II-latency-infected B-cells (95), suggests that the restriction of latency may not efficiently occur in AT patients.

Humanized mice are a potent model to study the early stages of EBV infection, establishment of latency III, and the immune system response (96). However, B-cell ontology is not complete in these mice, with little germinal center reactions or BCR maturation, impeding the study of latency II and I. Moreover, lytic infection cannot take place because of the absence of human epithelial cells. Recent advances have greatly improved the ontogeny of B-cells in these mice (97) and could open a new field for EBV study. An infection of these cells by EBV has, to our knowledge, not been yet assessed.

REFERENCES

- Miyashita EM, Yang B, Lam KM, Crawford DH, Thorley-Lawson DA. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells *in vivo*. *Cell* (1995) 80:593–601.
- Kim HJ, Ko YH, Kim JE, Lee SS, Lee H, Park G, et al. Epstein-barr virus-associated lymphoproliferative disorders: review and update on 2016 WHO classification. *J Pathol Transl Med.* (2017) 51:352–8. doi: 10.4132/jptm.2017.03.15
- Cohen JI. Primary Immunodeficiencies Associated with EBV disease. In: édité par Christian Münz, *Epstein Barr Virus Volume 1: One Herpes Virus: Many Diseases, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham: Springer International Publishing (2015), p. 241–65.
- Young LS, Rickinson AB. Epstein-barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* (2004) 4:757–68. doi: 10.1038/nrc1452
- Suarez F, Mahlaoui N, Canioni D, Andriamanga C, Dubois d'Enghien C, Brousse N, et al. Incidence, presentation, and prognosis of malignancies in ataxia-telangiectasia: a report from the french national registry of primary immune deficiencies. *J Clin Oncol.* (2015) 33:202–8. doi: 10.1200/JCO.2014.56.5101
- Nowak-Węgrzyn A, Crawford TO, Winkelstein JA, Carson KA, Lederman HM. Immunodeficiency and Infections in ataxia-telangiectasia. *J Pediatr.* (2004) 144:505–11. doi: 10.1016/j.jpeds.2003.12.046
- Woods CG, Bunday SE, Taylor AM. Unusual features in the inheritance of ataxia telangiectasia. *Hum Genet.* (1990) 84:555–62.
- Syllaba L., Henner K., Contribution à l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique. *Rev Neurol.* (1926) 1:541–60.
- Louis-Bar D. Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Stereotact Funct Neurosurg.* (1941) 4:32–42. doi: 10.1159/000106149
- Boder E, Sedgwick RP. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics* (1958) 2:526–54.
- Micol R, Ben Slama L, Suarez F, Le Mignot L, Beauté J, Mahlaoui N, et al. Morbidity and mortality from ataxia-telangiectasia are associated with ATM genotype. *J Allergy Clin Immunol.* (2011) 128:382–9.e1. doi: 10.1016/j.jaci.2011.03.052
- Crawford TO, Skolasky RL, Fernandez R, Rosquist KJ, Lederman HM. Survival probability in ataxia telangiectasia. *Arch Dis Child.* (2006) 91:610–1. doi: 10.1136/adc.2006.094268
- Micheli R, Pirovano S, Calandra G, Valotti M, Plebani A, Albertini A, et al. Low thymic output and reduced heterogeneity of Alpha/Beta, but not gamma/delta, T lymphocytes in infants with ataxia-telangiectasia. *Neuropediatrics* (2003) 34:165–67. doi: 10.1055/s-2003-41280
- Savitsky K, Bar-Shira A, Gilad S, Rotman G, Ziv Y, Vanagaite L, et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* (1995) 268:1749–53.
- Staples ER, Mc Dermott EM, Reiman A, Byrd PJ, Ritchie S, Taylor AM, et al. Immunodeficiency in ataxia telangiectasia is correlated strongly with the presence of two null mutations in the ataxia telangiectasia mutated gene. *Clin Exp Immunol.* (2008) 153:214–20. doi: 10.1111/j.1365-2249.2008.03684.x
- Shiloh Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer* (2003) 3:155–68. doi: 10.1038/nrc1011
- Lavin MF. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat Rev Molecul Cell Biol.* (2008) 9:759–69. doi: 10.1038/nrm2514
- Shiloh Y, Ziv Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress and more. *Nat Rev Molecul Cell Biol.* (2013) 14:197–210. doi: 10.1038/nrm3546
- Löbrich M, Jeggo PA. Harmonising the response to DSBs: a new string in the ATM bow. *DNA Repair* (2005) 4:749–59. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.12.008
- Morrison C, Sonoda E, Takao N, Shinohara A, Yamamoto K, Takeda S. The controlling role of ATM in homologous recombinational repair of DNA damage. *EMBO J.* (2000) 19:463–71. doi: 10.1093/emboj/21/9.3.463
- Pan Q, Petit-Frère C, Lähdesmäki A, Gregorek H, Chrzanowska KH, Hammarström L. Alternative end joining during switch recombination in patients with ataxia-telangiectasia. *Eur J Immunol.* (2002) 32:1300–8. doi: 10.1002/1521-4141(200205)32:5%3C1300::AID-IMMU1300%3E3.0.CO;2-L
- Choi M, Kipps T, Kurzrock R. ATM mutations in cancer: therapeutic implications. *Molecul Cancer Therap.* (2016) 15:1781–91. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0945

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MT performed the research and wrote the manuscript. OH wrote the manuscript. FS supervised the research and wrote the manuscript.

FUNDING

This work was supported by a grant from Fondation ARC pour la recherche sur le cancer (France) and a ministerial doctoral fellowship (France).

23. Spector BD, Filipovich AH, Perry GS, Kersey JH. Epidemiology of cancer in ataxia telangiectasia. In: Bridges BA, Harnden DG, editors. *Ataxia Telangiectasia—a Cellular and Molecular Link Between Cancer, Neuropathology and Immune Deficiency*. Chichester: John Wiley and Sons (1982). p. 103–38.
24. Epstein MA, Achong BG, Barr YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from burkitt's lymphoma. *Lancet* (1964) 1:702–3.
25. Sixbey JW, Nedrud JG, Raab-Traub N, Hanes RA, Pagano JS. Epstein-barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N Engl J Med*. (1984) 310:1225–30.
26. Lieberman PM. Chromatin structure of epstein-barr virus latent episomes. *Curr Top Microbiol Immunol*. (2015) 390 (Pt 1):71–102. doi: 10.1007/978-3-319-22822-8_5
27. Khanna R, Burrows SR, Kurilla MG, Jacob CA, Misko IS, Sculley TB, et al. Localization of epstein-barr virus cytotoxic t cell epitopes using recombinant vaccinia: implications for vaccine development. *J Exp Med*. (1992) 176:169–76. doi: 10.1084/jem.176.1.169
28. Thorley-Lawson DA, Hawkins JB, Tracy SI, Shapiro M. The pathogenesis of epstein-barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol*. (2013) 3:227–32. doi: 10.1016/j.coviro.2013.04.005
29. Uchida J, Yasui T, Takaoka-Shichijo Y, Muraoka M, Kulwichit W, Raab-Traub N. Mimicry of CD40 signals by epstein-barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* (1999) 286:300–03.
30. Kulwichit W, Edwards RH, Davenport EM, Baskar JF, Godfrey V, Raab-Traub N. Expression of the epstein-barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* (1998) 95:11963–8. doi: 10.1073/pnas.95.20.11963
31. Miller CL, Burkhardt AL, Lee JH, Stealey B, Longnecker R, Bolen JB, et al. Integral membrane protein 2 of epstein-barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* (1995) 2:155–66.
32. Caldwell RG, Wilson JB, Anderson SJ, Longnecker R. Epstein-barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* (1998) 9:405–11. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80623-8
33. Thorley-Lawson DA, Mann KP. Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med*. (1985) 162:45–59.
34. Giovanella B, Nilsson K, Zech L, Yim O, Klein G, Stehlin JS. Growth of diploid, epstein-barr virus-carrying human lymphoblastoid cell lines heterotransplanted into nude mice under immunologically privileged conditions. *Int J Cancer* (1979) 24:103–13. doi: 10.1002/ijc.2910240118
35. Zimber-Strobl U, Strobl LJ, Meitinger C, Hinrichs R, Sakai T, Furukawa T, et al. Epstein-barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of drosophila suppressor of hairless. *EMBO J*. (1994) 13:4973–82.
36. Kaiser C, Laux G, Eick D, Jochner N, Bornkamm GW, Kempkes B. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of epstein-barr virus nuclear antigen 2. *J Virol*. (1999) 73:4481–4.
37. Robertson ES, Grossman S, Johannsen E, Miller C, Lin J, Tomkinson B, et al. Epstein-barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J Kappa. *J Virol*. (1995) 69:3108–16.
38. Cooper A, Eric J, Seiji M, Ellen CM, Diego I, David D, et al. EBNA3A association with RBP-Jk down-regulates c-Myc and epstein-barr virus-transformed lymphoblast growth. *J Virol*. (2003) 77:999–1010. doi: 10.1128/JVI.77.2.999-1010.2003
39. Kanda T, Otter M, Wahl GM. Coupling of mitotic chromosome tethering and replication competence in epstein-barr virus-based plasmids. *Molecul Cell Biol*. (2001) 21:3576–88. doi: 10.1128/MCB.21.10.3576-3588.2001
40. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells *in vivo*. *Immunity* (1998) 9:395–404. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80622-6
41. Sun CC, Thorley-Lawson DA. Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the epstein-barr virus BZLF1 promoter. *J Virol*. (2007) 81:13566–77. doi: 10.1128/jvi.01055-07
42. Hawkins JB, Delgado-Eckert E, Thorley-Lawson DA, Shapiro M. The cycle of EBV infection explains persistence, the sizes of the infected cell populations and which come under CTL regulation. *PLOS Pathog*. (2013) 9:e1003685. doi: 10.1371/journal.ppat.1003685
43. Thorley-Lawson DA. EBV Persistence—Introducing the Virus. In: édité par Christian Münz, *Epstein Barr Virus Volume 1: One Herpes Virus: Many Diseases, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Cham: Springer International Publishing (2015). p. 151–209.
44. Bhende PM, Seaman WT, Delecluse HJ, Kenney SC. BZLF1 Activation of the methylated form of the BRLF1 immediate-early promoter is regulated by BZLF1 residue 186. *J Virol*. (2005) 79:7338–48. doi: 10.1128/JVI.79.12.7338-7348.2005
45. Kelly GL, Long HM, Stylianou J, Thomas WA, Leese A, Bell AI, et al. An epstein-barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed in transformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 Link. *PLoS Pathog*. (2009) 5:e1000341. doi: 10.1371/journal.ppat.1000341
46. Cohen M, Vistarop AG, Huaman F, Narbaitz M, Mettrebian F, De Matteo E, et al. Epstein-barr virus lytic cycle involvement in diffuse large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*. (2018) 36:98–103. doi: 10.1002/hon.2465
47. Altmann M, Wolfgang H. Epstein-barr virus provides a new paradigm: a requirement for the immediate inhibition of apoptosis. *PLoS Biol*. (2005) 3:e404. doi: 10.1371/journal.pbio.0030404
48. Morales-Sánchez A, Fuentes-Panana EM. The immunomodulatory capacity of an epstein-barr virus abortive lytic cycle: potential contribution to viral tumorigenesis. *Cancers* (2018) 10:E98. doi: 10.3390/cancers10040098
49. Callan MF, Steven N, Krausa P, Wilson JD, Moss PA, Gillespie GM, et al. Large clonal expansions of CD8+ T cells in acute infectious mononucleosis. *Nat Med*. (1996) 2:906–11. doi: 10.1038/nm0896-906
50. Schubert R, Reichenbach J, Zielen S. Deficiencies in CD4+ and CD8+ T cell subsets in ataxia telangiectasia. *Clin Exp Immunol*. (2002) 129:125–32. doi: 10.1046/j.1365-2249.2002.01830.x
51. Mallott J, Kwan A, Church J, Gonzalez-Espinosa D, Lorey F, Tang LF, et al. Newborn screening for SCID identifies patients with ataxia telangiectasia. *J Clin Immunol*. (2013) 33:540–9. doi: 10.1007/s10875-012-9846-1
52. Reichenbach J, Schubert R, Feinberg J, Beck O, Rosewich M, Rose MA, et al. Impaired interferon- γ production in response to live bacteria and Toll-like receptor agonists in patients with ataxia telangiectasia. *Clin Exp Immunol*. (2006) 146:381–89. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03221.x
53. Pashankar F, Singhal V, Akabogu I, Gatti RA, Goldman FD. Intact T cell responses in ataxia telangiectasia. *Clin Immunol*. (2006) 120:156–62. doi: 10.1016/j.clim.2006.04.568
54. Rivero-Carmena M, Porras O, Pelaez B, Pacheco-Castro A, Gatti RA, Regueiro JR. Membrane and transmembrane signaling in herpesvirus saimiri-transformed human CD4(+) and CD8(+) T lymphocytes is ATM-Independent. *Int Immunol*. (2000) 12:927–35. doi: 10.1093/intimm/12.6.927
55. McGrath-Morrow SA, Gower WA, Rothblum-Oviatt C, Brody AS, Langston C, Fan LL, et al. Evaluation and management of pulmonary disease in ataxia-telangiectasia. *Pediatr Pulmonol*. (2010) 45:847–59. doi: 10.1002/ppul.21277
56. Ocampo CJ, Peters AT. Antibody deficiency in chronic rhinosinusitis: epidemiology and burden of illness. *Am J Rhinol Allergy* (2013) 27:34–8. doi: 10.2500/ajra.2013.27.3831
57. Lefton-Greif MA, Crawford TO, Winkelstein JA, Loughlin GM, Koerner CB, Zahurak M, et al. Oropharyngeal dysphagia and aspiration in patients with ataxia-telangiectasia. *J Pediatr*. (2000) 136:225–31. doi: 10.1016/S0022-3476(00)70106-5
58. Vantourout P, Hayday A. Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat Rev Immunol*. (2013) 13:88–100. doi: 10.1038/nri3384
59. Carbonari M, Cherchi M, Paganelli R, Giannini G, Galli E, Gaetano C, et al. Relative increase of T cells expressing the gamma/delta rather than the alpha/beta receptor in ataxia-telangiectasia. *N Engl J Med*. (1990) 322:73–6. doi: 10.1056/NEJM19901113220201
60. Tangye SG, Palendira U, Edwards ES. Human immunity against EBV—lessons from the clinic. *J Exp Med*. (2017) 214:269–83.
61. Chijioke O, Müller A, Feederle R, Barros MH, Krieg C, Emmel V, et al. Human natural killer cells prevent infectious mononucleosis features by targeting lytic epstein-barr virus infection. *Cell Rep*. (2013) 5:1489–98. doi: 10.1016/j.celrep.2013.11.041
62. Palendira U, Rickinson AB. Primary immunodeficiencies and the control of epstein-barr virus infection. *Ann N Y Acad Sci*. (2015) 1356:22–44. doi: 10.1111/nyas.12937

63. Tangye SG. XLP: Clinical features and molecular etiology due to mutations in SH2D1A encoding SAP. *J Clin Immunol.* (2014) 34:772–79. doi: 10.1007/s10875-014-0083-7
64. Lopez-Granados E, Stacey M, Kienzler AK, Sierro S, Willberg CB, Fox CP, et al. A mutation in X-linked inhibitor of apoptosis (G466X) leads to memory inflation of Epstein-Barr virus-specific T cells. *Clin Exp Immunol.* (2014) 178:470–82. doi: 10.1111/cei.12427
65. Yuling H, Ruijing X, Li L, Xiang J, Rui Z, Yujuan W, et al. EBV-induced human CD8+ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV-associated malignancies. *Cancer Res.* (2009) 69:7935–44. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0828
66. Chung BK, Tsai K, Allan LL, Zheng DJ, Nie JC, Biggs CM, et al. Innate immune control of EBV-infected B cells by invariant natural killer T cells. *Blood* (2013) 122:2600–8. doi: 10.1182/blood-2013-01-480665
67. Bongartz CM. *INKT-Zellzahlen Bei Kindern Mit Erworbenener und Angeborener Immundefizienz.* Available online at: <https://docserv.uni-duesseldorf.de/servlets/DocumentServlet?id=42409>. (2017).
68. Chaigne-Delalande B, Li FY, O'Connor GM, Lukacs MJ, Jiang P, Zheng L, et al. Mg2+ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science* (2013) 341:186–91. doi: 10.1126/science.1240094
69. Martin E, Palmic N, Sanquer S, Lenoir C, Hauck F, Mongellaz C, et al. CTP synthase 1 deficiency in humans reveals its central role in lymphocyte proliferation. *Nature* (2014) 510:288–92. doi: 10.1038/nature13386
70. Li FY, Chaigne-Delalande B, Kanellopoulou C, Davis JC, Matthews HF, Douek DC, et al. Second messenger role for Mg2+ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature* (2011) 475:471–6. doi: 10.1038/nature10246
71. Kudoh A, Fujita M, Zhang L, Shirata N, Daikoku T, Sugaya Y, et al. Epstein-Barr virus lytic replication elicits ATM checkpoint signal transduction while providing an S-phase-like cellular environment. *J Biol Chem.* (2005) 280:8156–63. doi: 10.1074/jbc.M411405200
72. Hau PM, Deng W, Jia L, Yang J, Tsurumi T, Chiang AK. Role of ATM in the formation of the replication compartment during lytic replication of Epstein-Barr virus in nasopharyngeal epithelial cells. *J Virol.* (2015) 89:652–68. doi: 10.1128/JVI.01437-14
73. Yamamoto T, Ali MA, Liu X, Cohen JL. Activation of H2AX and ATM in Varicella-Zoster Virus (VZV)-infected cells is associated with expression of specific VZV genes. *Virology* (2014) 452–453:52–8. doi: 10.1016/j.virol.2013.12.039
74. Li R, Zhu J, Xie Z, Liao G, Liu J, Chen MR, et al. Conserved herpesvirus kinases target the DNA damage response pathway and TIP60 histone acetyltransferase to promote virus replication. *Cell Host Microbe* (2011) 10:390–400. doi: 10.1016/j.chom.2011.08.013
75. Sun Y, Jiang X, Chen S, Fernandes N, Price BD. A Role for the Tip60 Histone Acetyltransferase in the Acetylation and Activation of ATM. *Proc Natl Acad Sci USA* (2005) 102:13182–87. doi: 10.1073/pnas.0504211102
76. Olofsson BA, Kelly CM, Kim J, Hornsby SM, Azizkhan-Clifford J. Phosphorylation of Sp1 in response to DNA damage by ataxia telangiectasia-mutated kinase. *Molecular Cancer Res.* (2007) 5:1319–30. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0374
77. Kudoh A, Iwahori S, Sato Y, Nakayama S, Isomura H, Murata T, et al. Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J Virol.* (2009) 83:6641–51. doi: 10.1128/JVI.00049-09
78. Kvensakul M, Wei AH, Fletcher JI, Willis SN, Chen L, Roberts AW, et al. Structural basis for apoptosis inhibition by Epstein-Barr virus BHRF1. *PLoS Pathog.* (2010) 6:e1001236. doi: 10.1371/journal.ppat.1001236
79. Nikitin PA, Yan CM, Forte E, Bocedi A, Tourigny JP, White RE, et al. An ATM/Chk2-mediated DNA damage responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell Host Microbe* (2010) 8:510–22. doi: 10.1016/j.chom.2010.11.004
80. Henderson E, Miller G, Robinson J, Heston L. Efficiency of transformation of lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Virology* (1977) 76:152–63. doi: 10.1016/0042-6822(77)90292-6
81. Dutton A, Woodman CB, Chukwuma MB, Last JJ, Wei W, Vockerodt M, et al. Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood* (2007) 109:2597–603. doi: 10.1182/blood-2006-05-020545
82. Gruhne B, Sompallae R, Masucci MG. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009) 106:2313–8. doi: 10.1073/pnas.0810619106
83. Bose S, Yap LF, Fung M, Starzycynski J, Saleh A, Morgan S, et al. The ATM Tumour suppressor gene is down-regulated in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol.* (2009) 217:345–52. doi: 10.1002/path.2487
84. Ma X, Yang L, Xiao L, Tang M, Liu L, Li Z. Down-regulation of EBV-LMP1 radio-sensitizes nasal pharyngeal carcinoma cells via NF- κ B regulated ATM expression. *PLoS ONE* (2011) 6:e24647. doi: 10.1371/journal.pone.0024647
85. Maruo S, Zhao B, Johannsen E, Kieff E, Zou J, Takada K. Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing P16INK4A and P14ARF expression. *Proc Natl Acad Sci USA* (2011) 108:1919–24. doi: 10.1073/pnas.1019599108
86. Skalska L, White RE, Franz M, Ruhmann M, Allday MJ. Epigenetic repression of p16(INK4A) by latent Epstein-Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathog.* (2010) 6:e1000951. doi: 10.1371/journal.ppat.1000951
87. Knight JS, Robertson ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C regulates cyclin A/p27 complexes and enhances cyclin A-dependent kinase activity. *J Virol.* (2004) 78:1981–91. doi: 10.1128/JVI.78.4.1981-1991.2004
88. Choudhuri T, Verma SC, Lan K, Murakami M, Robertson ES. The ATM/ATR signaling effector Chk2 is targeted by Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C to release the G2/M cell cycle block. *J Virol.* (2007) 81:6718–30. doi: 10.1128/JVI.00053-07
89. Saha A, Bamidele A, Murakami M, Robertson ES. EBNA3C attenuates the function of p53 through interaction with inhibitor of growth family proteins 4 and 5. *J Virol.* (2011) 85:2079–88. doi: 10.1128/JVI.02279-10
90. Gruhne B, Sompallae R, Masucci MG. Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene* (2009) 28:3997–4008. doi: 10.1038/onc.2009.258
91. Singh VV, Dutta D, Ansari MA, Dutta S, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the ATM and H2AX DNA damage response early during de novo infection of primary endothelial cells, which plays roles in latency establishment. *J Virol.* (2014) 88:2821–34. doi: 10.1128/JVI.03126-13
92. Kulinski JM, Leonardo SM, Mounce BC, Malherbe L, Gauld SB, Tarakanova VL. Ataxia telangiectasia mutated kinase controls chronic gammaherpesvirus infection. *J Virol.* (2012) 86:12826–37. doi: 10.1128/JVI.00917-12
93. Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell* (2010) 141:970–81. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.038
94. Harding SM, Boiarsky JA, Greenberg RA. ATM dependent silencing links nucleolar chromatin reorganization to DNA damage recognition. *Cell Rep.* (2015) 13:251–9. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.085
95. Hansmann ML, Hell K, Küppers R. Hodgkin cells are clonal B-cells in various stages of differentiation. *Der Pathologe* (1995) 16:88–93. doi: 10.1007/s002920050081
96. Münz C. EBV infection of mice with reconstituted human immune system components. In: *édité par Christian Münz. Epstein Barr Virus Volume 2: One Herpes Virus: Many Diseases, Current Topics in Microbiology and Immunology.* Cham: Springer International Publishing (2015). p. 407–23.
97. Yu H, Borsotti C, Schickel JN, Zhu S, Strowig T, Eynon EE, et al. A novel humanized mouse model with significant improvement of class-switched, antigen-specific antibody production. *Blood* (2017) 129:959–69. doi: 10.1182/blood-2016-04-709584

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Tatfi, Hermine and Suarez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Titre : Rôle de la protéine ATM dans le contrôle de la latence du virus d'Epstein-Barr

Mots clés : lymphome, EBV, ataxie-télangiectasie, ATM

Résumé : Le virus Epstein-Barr (EBV) est un herpesvirus qui infecte environ 95% des adultes dans le monde. La plupart des gènes codés par le virus sont exprimés au cours du cycle lytique, qui se déroule dans l'épithélium oropharyngé, et contribuent à la production de particules virales. En revanche, seul un répertoire restreint de gènes est exprimé pendant la latence, qui s'établit dans les lymphocytes B des tissus lymphoïdes sous-jacents, permettant une persistance du virus dans l'organisme. Les différentes phases de l'infection à EBV sont soigneusement contrôlées tout au long de la vie de l'hôte infecté, et l'infection chronique chez les individus immunocompétents est généralement asymptomatique. Cependant, un contrôle inefficace de la latence virale peut contribuer au développement de tumeurs malignes telles que le lymphome de Burkitt, le lymphome Hodgkinien et le carcinome du nasopharynx.

Plusieurs déficits immunitaires primitifs (DIP) s'accompagnent d'une réponse anormale contre l'EBV et constituent des facteurs de risque de tumeurs associées à l'EBV. L'Ataxie Télangiectasie (AT) est un DIP rare causé par une mutation bi-allélique du gène Ataxia Télangiectasia Mutated (ATM), impliqué dans la réparation des cassures double-brins de l'ADN. Les patients atteints d'AT ont un risque accru de cancers constitués principalement de tumeurs malignes lymphoïdes B induites par EBV. L'hypothèse prédominante pour expliquer cette augmentation d'incidence est basée sur le rôle de la protéine ATM dans la réparation de l'ADN. Cependant, la forte association des lymphomes avec l'EBV suggère également un rôle oncogénique du virus. Les patients atteints d'AT présentent rarement une immunodéficience profonde et la plupart des patients ne présentent pas d'infections opportunistes.

Cela soulève l'hypothèse que le défaut de fonction d'ATM chez les patients atteints d'AT pourrait être associé à un contrôle moins stringent de la latence de l'EBV dans les lymphocytes B, favorisant ainsi les propriétés

oncogéniques du virus. Outre la réparation de l'ADN, ATM intervient également dans une multitude de voies de signalisation telles que le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le métabolisme mitochondrial et l'homéostasie des télomères. De plus, ATM est impliqué dans l'inhibition de la transcription au voisinage d'une cassure double brin, que ce soit dans l'ADN nucléaire ou ribosomal. Par ses multiples fonctions, ATM intervient dans le contrôle de la latence du virus du sarcome de Kaposi (KSHV) et du γ -herpesvirus murin 68 (MHV68), tous deux analogues à l'EBV.

Pour évaluer l'implication d'ATM dans la régulation du cycle latent d'EBV, nous avons séquencé l'ARN de lignées lymphoblastoïdes issues de patients atteints d'AT (LCL-AT) et de donneurs sains (LCL-WT), pour explorer les profils d'expression spécifiques à la fois au génome cellulaire et viral. Nous montrons que les LCL-AT présentent un profil d'expression compatible avec l'incidence accrue de tumeurs malignes chez les patients atteints d'AT, notamment par la surexpression d'oncogènes et l'inhibition d'expression de suppresseurs de tumeurs. Nos données suggèrent également un défaut ribosomal conduisant à une inhibition de la traduction dans les LCL-AT. Ces modifications semblent impacter les interactions avec certains gènes de latences de l'EBV, comme EBNA-3A, EBNA-3C et LMP1, ce qui pourrait favoriser le potentiel oncogénique du virus. Certaines voies dérégulées découvertes par cette approche devront être explorées plus en profondeur afin de mieux comprendre les mécanismes intrinsèques à la cellule, impliqués dans la régulation de la latence et la lymphomagenèse de l'EBV. L'élucidation de ces voies pourrait contribuer à la mise au point de nouvelles approches pour traiter ou prévenir les lymphoproliférations associées à l'EBV chez les patients atteints d'AT, où la chimiothérapie conventionnelle est très toxique en raison du défaut de réparation de l'ADN, mais aussi dans la population générale.



Title : Role of ATM protein in the control of Epstein-Barr virus latency

Keywords : lymphoma, EBV, ataxia-telangiectasia, ATM

Abstract : Epstein-Barr virus (EBV) is a herpes virus that infects about 95% of adults worldwide. Most genes encoded by the virus are expressed during the lytic cycle, which occurs in the oropharyngeal epithelium, and contribute to the production of viral particles. On the other hand, only a restricted repertoire of genes is expressed during latency, which is established in B-cells of underlying lymphoid tissues, allowing persistence of the virus in the body. The different phases of EBV infection are carefully controlled throughout life of the infected host, and chronic infection in immunocompetent individuals is usually asymptomatic. However, ineffective control of viral latency contributes to the development of malignancies such as Burkitt's lymphoma, Hodgkin's lymphoma, and nasopharyngeal carcinoma.

Several primary immunodeficiencies (PIDs) are associated with a poor EBV response and are at increased risk for EBV-related malignancies. Ataxia Telangiectasia (AT) is a rare PID caused by a biallelic mutation in the Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) gene, involved in DNA double-strand breaks repair. Patients with AT have an increased risk of cancers consisting mainly of EBV-induced B-cells lymphoid malignancies. The predominant hypothesis for this increased incidence is based on the role of the ATM protein in DNA repair. However, the strong association of lymphomas with EBV also suggests an oncogenic role of the virus. Overt immunodeficiency are uncommon in patients with AT and most patients do not have opportunistic infections.

This raises the hypothesis that the lack of ATM function in AT patients may be associated with a less stringent control of EBV latency in B-cells, thus promoting the oncogenic properties

of the virus. In addition to DNA repair, ATM is also involved in a multitude of signaling pathways such as cell-cycle control, apoptosis, mitochondrial metabolism, and telomere homeostasis. In addition, ATM is involved in the inhibition of transcription in the vicinity of a double-strand break, whether in nuclear or ribosomal DNA. By its multiple functions, ATM intervenes in controlling the latency of Kaposi's sarcoma virus (KSHV) and murine γ -herpesvirus 68 (MHV68), both related to EBV.

To evaluate the involvement of ATM in the regulation of EBV latent cycle, we performed RNA-seq of lymphoblastoid cell lines from patients with AT (LCL-AT) and healthy donors (LCL-WT), to explore the specific expression patterns of both the cellular and viral genomes. We show that LCL-AT exhibit an expression pattern consistent with the increased incidence of malignancies in AT patients, including overexpression of oncogenes and inhibition of tumor suppressor. Our data also suggest a ribosomal defect leading to inhibition of translation in LCL-AT. These modifications appear to impact the interactions with certain EBV latency genes, such as EBNA-3A, EBNA-3C and LMP1, which could favor the oncogenic potential of the virus. Several deregulated pathways uncovered by this approach need to be further explored to better understand the cell intrinsic mechanisms involved in the regulation of EBV latency and lymphomagenesis. Elucidation of these pathways could contribute to the development of new approaches to treat or prevent EBV-associated lymphoproliferation in AT patients, where conventional chemotherapy is very toxic because of lacking DNA repair, but also in the general population.