

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Ecole Doctorale Bio-Santé n°524

UMR CNRS 7276 - CRIBL

Contrôle de la Réponse Immune B et Lymphoproliférations

Equipe « Mécanismes moléculaires de la Lymphomagénèse »

Thèse n°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Sciences, Santé

Spécialité : **Immunologie, Cancérologie, Virologie**

Présentée et soutenue publiquement par :

Héloïse AUCLAIR

Le 6 Octobre 2017

Etude des homologies phénotypiques et fonctionnelles des lymphocytes B en latence III de l'EBV avec les cellules B régulatrices, implication de l'axe PD-1/PD-L1

Thèse co-dirigée par le Professeur Jean FEUILLARD et le Docteur Chantal JAYAT-VIGNOLES

Jury :

Présidente :

Mme Joëlle WIELS, DR1, CNRS, Villejuif

Rapporteurs :

M. Sylvain LATOUR, DR1, INSERM, Paris

M. Pierre BUSSON, DR2, CNRS, Villejuif

Examineurs :

M. Olivier MORALES, IGR, HDR, CNRS, Lille

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, CNRS, Limoges

Mme Chantal JAYAT-VIGNOLES, MCU, CNRS, Limoges

A Mamie,

A mes parents,

A Antho

Remerciements

Je commencerai par remercier le Pr Michel COGNE, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Je le remercie pour son soutien lors des demandes de post-doc, et pour ses précieux contacts.

Je tiens à remercier le Pr Jean FEUILLARD, pour m'avoir encadrée tout au long de cette thèse. Merci Jean de m'avoir fait confiance durant ces trois années et de m'avoir encouragée et soutenue comme vous l'avez fait.

Un énorme merci à Chantal JAYAT-VIGNOLES, qui a été bien plus qu'une co-encadrante de thèse. Je la remercie pour ses compétences, tous ses conseils, discussions de la vie, fous rires et sa grande humanité. Vous resterez pour moi une personne très importante qui aura marqué ma vie !

Je remercie sincèrement Mme Joëlle WIELS, pour avoir accepté de présider mon jury de thèse.

J'exprime ma profonde gratitude envers M. Pierre BUSSON et M. Sylvain LATOUR, pour avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse. Je tiens à remercier également M. Olivier MORALES, pour avoir lu mon manuscrit et examiné ce travail. Je le remercie pour ces échanges très constructifs lors de congrès.

Je tiens à remercier chaleureusement Cathy, qui m'a soutenue durant toute la thèse et qui est devenue une amie. Je te souhaite tout le meilleur avec Tan et tes deux loulouttes !

Je remercie tous les membres de l'équipe de Jean : Nathalie, merci pour ces discussions et ta contribution à la science ! Christelle, merci pour tes conseils avisés, ton soutien et nos moments partagés. Je te souhaite bonne continuation. Robin, merci pour tes conseils et d'avoir supporté ma voix qui porte près de ton bureau ! Je remercie Racha, ma cocotte toujours de bonne humeur ! Je te souhaite une superbe vie, tu le mérites ! Valéria, je te souhaite bon courage pour la fin de ta thèse ! Merci pour ces échanges en espagnol ! Emilie, j'espère que ton souhait d'aller aux Etats-Unis en post-doc se réalisera ! Je remercie également Morgane, qui nous a apporté sa bonne humeur

au labo durant son M1 et M2. Je remercie Pauline, ma stagiaire de compétition qui est restée quelques mois de plus en notre compagnie. Je te souhaite un superbe M2 et tout le bonheur que tu mérites. Je tiens à remercier aussi Hussein et Jack, que j'ai pu encadrer durant leurs M1 et avec qui ça a été un plaisir de travailler !

Je remercie aussi tous mes collègues de l'équipe de Michel COGNE, pour leur bonne humeur et nos discussions dans les couloirs. Merci Christophe pour avoir été tuteur de mes enseignements, pour tes discussions et ta bonne humeur ! Je remercie Jeanne pour sa gentillesse et ses corrections en anglais. Mais aussi merci à Claire, Sophie, Eric, Laurent pour leurs discussions et leurs conseils avisés. Je remercie mes supers copines Hend et Audrey, et aussi mes collègues de thèse et de post-doc : Ophélie, Iman, Zeinab, Omar, Jean-Marie, Alexis, Nour, et tous les autres ! Merci pour ces moments partagés ensemble, je vous souhaite tous une belle réussite dans ce domaine.

Enfin, je tiens à remercier les personnes qui m'entourent au quotidien et qui m'ont toujours soutenue. Un énorme merci à mes parents, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui. Vous m'avez toujours encouragée et donné le meilleur, je vous dois tout. Je suis fière de vous avoir en exemple. Merci à mon frère Quentin, pour ces moments partagés ensemble. Une grande pensée à ma sœur, la vie nous a éloignée mais tu restes toujours dans mon cœur. Je te souhaite une vie meilleure et que l'on se voie plus. Merci à mes supers tontons et tata Joël, Pascal et Roselyne, ainsi que ma grand-mère Renée. Je remercie mes cousins : Marion, Guillaume, Elise, Célia et Antonin pour nos réunions de famille et les bons moments que l'on a passé ensemble. Une grande pensée pour toi Tata, qui est partie trop tôt au ciel. Tu me donnes la force de me battre au quotidien. Une énorme pensée à toi mamie, qui nous a quitté cette année. Merci de m'avoir enseigné la pâtisserie et cette grande philosophie de vie.

Un grand merci à mes ami(e)s les plus proches : Claire, déjà plus de 20 ans que l'on se connaît ! Marie-Elisa, merci pour ton soutien sans faille et ta présence ! Sandra & Tom, je vous souhaite le meilleur avec Lou et Abel ! Amandine, je suis tellement contente de t'avoir rencontrée, tu es la bonté à l'état pur ! Un grand merci à Fabychou, ma globetrotteuse à qui je dois beaucoup ! Sarah et Juliette, merci pour votre soutien

et votre véritable amitié. Manon et Céline, merci pour ces moments ensemble ! Je dois oublier plein de personnes, je remercie tous ceux qui m'entourent chaleureusement et qui m'ont soutenue à un moment dans ma vie.

Enfin, je te remercie Antho, d'être dans ma vie et d'autant me soutenir et m'encourager. Tu es un pilier pour moi, j'ai de la chance de t'avoir et je nous souhaite tout le bonheur possible ! Je remercie également ma belle famille, qui m'a accueillie à bras ouverts. Merci Sylvie, ma super belle mère qui me fait beaucoup rire, mais aussi Nathalie, Rose-Marie, Jean-Luc. Merci Philippe et Christelle, pour nous accueillir aussi bien à chaque fois.

ABBREVIATIONS

A

5'-AMP : Adénosine-5' MonoPhosphate
ABC : Cellule B Activée
ACKR3 : Récepteur Atypique de la Chémokine de type 3
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADO : Adénosine
AHSCT : Transplantation de Cellules Souches Hématopoïétiques Autologues
Ala : Alanine
AP-1 : Protéine Activatrice-1
APC : Antigen-Presenting Cell
APRIL : A Proliferation Inducing Ligand
AR : Autosomal Récessif
ARNm : ARN messenger
ATF : Facteur Activateur de Transcription

B

B7-H1 : Homologue de B7 de type 1
BART : BamHI-A Rightward Transcript
BARF : BamHI-A Rightward Fragment
BCL10 : B-cell lymphoma/leukaemia 10
BCL2L11 : Bcl-2-like Protein 11
BCR : Récepteur du Lymphocyte
BIR : Baculovirus IAP Repeat
BIRC4 : Baculoviral IAP repeat-containing protein 4
BL : Lymphome de Burkitt
Bregs : Cellules B Régulatrices
BRLF1 : BamHI Rightward reading Frame 1
Btk : Tyrosine kinase Bruton
BZLF1 : BamHI Leftward reading Frame 1

C

CAEBV : maladie active chronique de l'EBV
CARMA : CARD-containing MAGUK protein
CBF β : Sous-Unité β du Facteur de Liaison au Noyau
CBF-1 : Facteur de Liaison au promoteur C de type 1
CCL : Ligand de Chémokine
CD40L : Ligand de CD40
CG : Carcinome Gastrique

CHH : Carcinome Hépatocellulaire Humain
Chip-Seq : Séquençage de l'Immunoprécipitation de la Chromatine

clLH : Lymphome de Hodgkin classique

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CR : Région Conservée

CREB : C-AMP Response Element-Binding protein

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CT : Cycle Threshold

CTAR : Région Activatrice de la partie C-Terminale

CTL : Lymphocyte T Cytotoxique

CTLA-4 : Protéine associée aux lymphocytes T cytotoxiques

CU : Colite Ulcéreuse

CXCL : C-X-C motif Ligand chemokine

CXCR : C-X-C Récepteur à la Chémokine

COX : Cyclo-Oxygénase

D

DAG : diacylglycerol

DC : Cellule Dendritique

DID : Diabète Insulinodépendant

DLBCL : Lymphome B Diffus à Grandes Cellules

dUTPase : deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase

E

EA : Antigène précoce

EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

EAU : Uvéite Auto-immune Expérimentale

EBER : EBV-encoded RNA

EBI3 : Epstein-Barr Induced 3

EBNA : Antigène Nucléaire de l'Epstein-Barr Virus

EBVaGC : Cancer Gastrique associé à l'EBV

EBV : Virus d'Epstein-Barr

EIF2 α : Eukaryotic translation Initiation Factor 2 alpha

EPOCH : Etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide, doxorubicine

ERO : Espèce réactive de l'oxygène

F

FADD: Fas-associated protein with death domain

FoxP3 : Forkhead box P3

G

GA_r : Répétition de Glycine-Alanine

GC: Centre Germinatif

Gly : Glycine

GL : Granulomatose Lymphomatoïde

GLG : Grand Lymphocyte Granuleux

Gp : Glycoprotéine virale

GrB : Granzyme B

GvH chronique : Maladie chronique du Greffon contre l'Hôte

H

HAUSP : Protéase Spécifique de l'Ubiquitine Associée aux Herpèsvirus

HBV : Virus de l'Hépatite B

HCV : Virus de l'Hépatite C

HDAC : Histone Désacétylase

HDACi : Inhibiteur des

Histones Désactéylase

HHV : Herpesvirus Humain

HIF1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α

hIL-10 : IL-10 d'origine humaine

HIV-HL : Lymphomes de Hodgkin associés au VIH

HLA-DR : Human Leucocyte Antigen – antigen D-Related

HRS : Cellule de Reed-Sternberg issue de lymphome de Hodgkin

HSV : Herpès Simplex Virus

HVSK : Herpès Virus lié au Sarcome de Kaposi

I

IB : Indice Bactériologique

ICAM : Molécule d'Adhésion Intercellulaire

ICOS : Inducible T-Cell Costimulator

IDO : Indoleamine 2,3-DiOxygénase

IE : Immediate Early

IFN : Interféron

Ig : Immunoglobuline

IKK : I κ B Kinase

IL-10 : Interleukine-10

IL-10R : Récepteur de l'Interleukine-10

ILD : Maladie Interstitielle Pulmonaire

IFN : Interféron

iNKT : NKT invariant

IP3 : inositol trisphosphate

IP3R : inositol trisphosphate receptor

IP10 : Interferon gamma-induced Protein 10

IPF : Fibrose Pulmonaire Idiopathique

IR : Séquence Répétée Interne

IRF : Interferon Regulatory Factor

ISS : Score Pronostic International

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

ITK : interleukin-2 inducible T cell kinase

iTreg : Lymphocyte T Régulateur induit

J

JAK : JAnus Kinase

JNK : C-Jun N-terminal Kinases

K

KO : Knock Out

L

LB : Lymphome de Burkitt

LCK: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase

LCL : Lignée de cellules lymphoblastoïdes

LCV : Lymphocryptovirus

LE : Lupus Erythémateux

LED : Lupus Erythémateux Disséminé

LETNK : Lymphome Extranodal T/NK

LH : Lymphome Hodgkinien

LHF : Lymphohistiocytose Hémophagocytaire Familiale

LHH : Lymphohistiocytose Hémophagocytaire

LH-VIH : lymphomes de Hodgkin associés au VIH

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

LMP : Protéine Membranaire de Latence

LNH : Lymphome Non Hodgkinien

LP : Protéine Leader

LP : Lymphome Plasmablastique

LPSNC : Lymphome Primitif du Système Nerveux Central

LPS : Lipopolysaccharide
LPS : Lymphome Primitif des
Séreuses
LTb : Lymphotoxin b Receptor

M

MA : Antigène de membrane
MAGT1 : magnesium
transporter 1
MALT : mucosa-associated
lymphoid tissue lymphoma
translocation protein
MAPK : mitogen-activated
protein kinase
MCP : Monocyte Chemotactic
Protein
MDSC : Myeloid-Derived
Suppressor Cell
Mg²⁺ : Magnésium
Mi-ARN : Micro-ARN
MI : Mononucléose Infectieuse
MICI : Maladie Inflammatoire
Chronique de l'Intestin
MII : Maladie Inflammatoire de
l'Intestin
MIG : Monokine Induced by
gamma interferon
MNI : Mononucléose Infectieuse

N

NCK : non-catalytic region of
tyrosine kinase adaptor protein
NF-κB : Facteur Nucléaire-κB
NFAT : nuclear factor of
activated T cells
NIK : Kinase Inductrice du
Facteur Nucléaire-κB
NK : Cellule tueuse naturelle
NKT : Cellule tueuse naturelle T
NKTCL : Lymphome à Cellules
NK/T
NLRP3 : NOD-like receptor
family, pyrin domain containing
3
NLS : Séquence de Localisation
Nucléaire
Nm : Nanomètre
NPC : Carcinome Nasopharyngé
nTreg : Lymphocyte T
Régulateur naturel

O

OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OriLyt : Origine de réplication Lytique
OriP : Origine de réplication latente
ORF : Cadre de Lecture Ouvert

P

PAL : Lymphome Associé au Pyothorax
pb : Paire de Bases
PBCM : Cellule Mononuclée du Sang
Périphérique
PD-1 : Program Death-1
pDC : Cellule Dendritique plasmocytoïde
PDGF : Facteur de croissance dérivé des
plaquettes
PD-L1 : Program Death –Ligand 1
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : PhosphatidyInositol 3 Kinase
PIP2 : phosphatidyl inositol bisphosphate
PKC : Protéine Kinase C
PKR : Protéine Kinase activée par l'ARN
PMA : phorbol-12-myristate-13-acetate
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PTLD : Désordre Lymphoprolifératif Post-
Transplantation

R

R-S : Reed-Sternberg
Ra : Récepteur antagoniste
RANKL : Receptor Activator of Nuclear
factor Kappa-B Ligand
RASGRP : RAS guanyl nucleotide–
releasing protein
RB ; Rétinoblastome
RBP-Jκ : Protéine de Liaison de la
Recombinaison de Jκ
RCH : Rectocolite Hémorragique
RE : Réticulum Endoplasmique
RHOH : Ras homolog gene family member
H
RIG-I : Retinoic acid Inducible-Gene I
RING : Really Interesting New Gene
RIP : Protéine Intéragissant avec le
Récepteur
Rta : R transactivator
RUNX3 : Facteur de Transcription lié à
Runt de type 3

S

SAC : *Staphylococcus aureus*
Cowan

SAP : SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) associated protein

SAPK : Protéine Kinase Activée par le Stress

sCD30 : CD30 soluble

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

SEP : Sclérose En Plaque

Ser : Sérine

SH2 : Src homology 2

SIDA : Syndrome d'ImmunoDéfiance Acquis

SLAM : signalling lymphocyte activation molecule

SLAMF : Famille des signalling lymphocyte activation molecule

SLCL : Lignée Cellulaire Lymphoblastoïde Spontanée

SLP-76 : SH2 domain-containing leucocyte protein of 76 kDa

SNC : Système Nerveux Central

STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription

STIM1 : stromal interaction molecule 1

STK4 : serine/threonine protein kinase 4

T

T/NK LPD : Maladie lymphoproliférative T/NK

ta1 : thymosine- α 1

TAB 1 : TAK1-binding protein

TAD : Domaine de TransActivation

TAP : Protéine de Transport des Antigènes

tBreg : tumor-evoked regulatory B-cell

TEM : Transition Epithélio-Mésenchymateuse

Tfh : T helper folliculaire

Th : Lymphocyte T helper

TIL : Tumor-Infiltrating

TGF- β : Transforming Growth Factor beta

TLR : Récepteur de type Toll-like

TNFAIP3 : TNF Alpha Induced Protein 3

TNFR : Récepteur du Facteur de Nécrose Tumorale

TP-1 : Protéine virale Terminale de type 1

TR : Séquence Terminale Répétée

TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain

TRAF : Facteur associé au TNFR

TRAP : Autophagosomes libérés des tumeurs

Treg : Lymphocyte T Régulateur

U

U_L : Séquence Unique longue

U_S : Séquence Unique courte

USP : Protéine Spécifique de l'Ubiquitine

V

VCA : Antigène de la Capside Virale

VIH : Virus de l'Immunodéfiance Humaine

vIL-10 : IL-10 d'origine virale

VRS : Virus Respiratoire Syncytial

VZV : Herpesvirus Varicellae

W

WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein

WDR48 : Répétition WD contenant la protéine 48

WIP : WASP-interacting protein

X

XIAP : Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X

XLP : Syndrome lymphoprolifératif lié à l'X

Z

ZAP70 : z-chain associated protein kinase of 70 kDa

ZEBRA : Z, EB Reactivation Activator

LISTE DES FIGURES

<u>Figure 1</u> : Structure commune des <i>Herpesviridae</i>	15
<u>Figure 2</u> : Déroulement des infections par les Herpèsvirus.	16
<u>Figure 3</u> : Particules de l'EBV observées en microscopie électronique.	17
<u>Figure 4</u> : Représentation schématique du génome de l'EBV sous sa forme linéaire.	19
<u>Figure 5</u> : Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV.	20
<u>Figure 6</u> : Structure du génome de l'EBV sous sa forme épisomale.....	21
<u>Figure 7</u> : Schéma représentant le cycle biologique de l'EBV.	22
<u>Figure 8</u> : Schéma illustrant le cycle de réplication lytique de l'EBV.	24
.....	25
<u>Figure 9</u> : Passage de la phase de latence au cycle lytique par la protéine ZEBRA de l'EBV.	25
<u>Figure 10</u> : Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction des différents types de latence.....	26
<u>Figure 11</u> : Représentation schématique de la cinétique d'infection des lymphocytes B par l'EBV <i>in vitro</i>	30
<u>Figure 12</u> : Infection primaire et persistante par l'EBV <i>in vivo</i> chez des individus immunocompétents.	34
<u>Figure 13</u> : Schéma représentant la structure de la protéine EBNA1.....	36
<u>Figure 14</u> : Schéma représentant la structure de la protéine EBNA2.....	38
<u>Figure 15</u> : Schéma représentant la structure des protéines EBNA3A, -3B, -3C.	40
<u>Figure 16</u> : Structure de la région codante de la protéine EBNA-LP.....	41
<u>Figure 17</u> : Structure de la protéine LMP1.....	43
<u>Figure 18</u> : Modifications cellulaires induites par l'expression de LMP2A.	46
<u>Figure 19</u> : Mimétisme de CD40 par LMP1 et activation de la voie NF- κ B.	52
<u>Figure 20</u> : Détournement de la voie PI3K/Akt par LMP1.	54
<u>Figure 21</u> : Protéines de latence préférentiellement ciblées par les lymphocytes T CD4+ et CD8+.....	63
<u>Figure 22</u> : Réponses immunitaires médiées par les anticorps lors des différentes phases de l'infection par l'EBV.....	66
<u>Figure 23</u> : Mutation des gènes impliqués dans la voie de signalisation du TCR conduisant à une susceptibilité à l'EBV.....	83
<u>Figure 24</u> : Modèles de développement des Bregs.....	102

<u>Figure 25</u> : Traitements ciblant PD-1 et ses ligands, PD-L1 et PD-L2.....	108
<u>Figure 26</u> : Expression relative des ARNm de l' <i>IL-10</i> lors de l'inhibition de NF- κ B par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives.	186
<u>Figure 27</u> : Expression relative des ARNm de l' <i>IL-10</i> lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives.....	187
<u>Figure 28</u> : Expression relative des ARNm de l' <i>IL-35</i> (<i>EBI3</i> et <i>IL12A</i>) lors de l'inhibition de NF- κ B par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives.	189
<u>Figure 29</u> : Expression relative des ARNm de l' <i>IL-35</i> (<i>EBI3</i> et <i>IL12A</i>) lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives...	191
<u>Figure 30</u> : Expression relative des ARNm de <i>TGF-β1</i> lors de l'inhibition de NF- κ B par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives.	192
<u>Figure 31</u> : Expression relative des ARNm de <i>TGF-β1</i> lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives <i>versus</i> latence III positives.	193
.....	194
<u>Figure 32</u> : Schéma récapitulatif des mécanismes sous-jacents à la régulation de l'expression transcriptionnelle de l' <i>IL-10</i> , d' <i>IL-35</i> et de <i>TGF-β1</i> par c-Myc et NF-B dans les lignées en programme de latence III de l'EBV.	194
<u>Figure 33</u> : Schéma représentant la méthode de détection des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'EBV.....	205
<u>Figure 34</u> : Schéma récapitulatif des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules B en latence III de l'EBV.....	209

LISTE DES TABLEAUX

<u>Tableau 1</u> : Différents groupes des <i>Herpesviridae</i> chez l'Homme	16
<u>Tableau 2</u> : Programme de l'EBV, tropisme cellulaire et pathologies associées.	35
<u>Tableau 3</u> : Lymphomes B associés à l'EBV chez les sujets immunocompétents.	69
<u>Tableau 4</u> : Troubles génétiques de la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK associés à la lymphohistiocytose hémato-phagocytaire.....	74
<u>Tableau 5</u> : Principales déficiences en lymphocytes T entraînant des pathologies associées à l'EBV.	77
<u>Tableau 6</u> : Lymphomes associés à l'EBV chez les sujets immunodéprimés.....	85
<u>Tableau 7</u> : Différents sous-types de Bregs humains.	98
<u>Tableau 8</u> : Différentes sous-populations de Tregs humains.	115

TABLE DES MATIERES

Avant-propos	9
Chapitre I : Introduction bibliographique.....	13
Partie 1 : Le virus d'Epstein-Barr.....	15
I/La famille des Herpesviridae.....	15
II/ Découverte originelle et historique du virus de l'EBV	17
III/ Structure du virion	18
IV/ Structure du génome.....	19
.....	21
V/ Cycle biologique de l'EBV.....	21
V.1. Le cycle lytique.....	23
V.1.A. Lors de la primo-infection.....	23
V.1.B. Facteurs favorisant la réactivation virale	24
V.2. La latence virale.....	25
V.2.A. Latence III	26
V.2.B. Latence II.....	27
V.2.C. Latence I.....	27
V.2.D. Latence 0	28
V.2.E. Latence atypique.....	28
V.3. Physiopathologie de l'infection par l'EBV	29
V.1.A. Cellules-cibles de l'EBV	29
V.1.A.1. Cibles conventionnelles	29
V.1.A.1.a. Les lymphocytes B.....	29
V.1.A.1.b Les cellules épithéliales	30
V.1.B.1. Cibles non conventionnelles	31
V.1.B.1.a. Les lymphocytes T	31
V.1.B.1.b. Les cellules NK.....	32
V.1.B.1.c. Les monocytes.....	33
V.1.B. Infection par l'EBV in vivo et persistance virale	33
VI. Caractéristiques des cellules en latence III de l'EBV.....	35
VI.1. Protéines et ARNs viraux de la latence III	36
VI.1.A. Protéines nucléaires	36
VI.1.A.1. EBNA1	36
VI.1.A.2. EBNA2	37
VI.1.A.3. Les EBNA3	39
VI.1.A.4. EBNA-LP.....	41
VI.1.B. Protéines membranaires.....	42
VI.1.B.1. LMP1.....	42

VI.1.B.2. LMP2A.....	45
VI.1.B.3. LMP2B	46
VI.1.C. ARNs viraux de latence.....	47
VI.1.C.1. Les EBERs	47
VI.1.C.2. Les BARTs et les micro-ARNs	47
VI.2. Caractéristiques phénotypiques des cellules B en latence III de l'EBV	50
VI.3. Cytokines sécrétées par les cellules B en latence III de l'EBV	50
VI.3.A. Voies de signalisation détournées par la latence III de l'EBV	51
VI.3.A.1. NF-κB.....	51
VI.3.A.2. c-Myc	53
VI.3.A.3. PI3K/AKT	53
VI.3.A.4. JNK	54
VI.3.A.5. Les STATs	55
VI.3.A.6. P38/MAPK.....	55
Partie 2 : Réponse immunitaire anti-EBV et rupture de l'équilibre hôte/virus	57
I/ Immunosurveillance de l'EBV	57
I.1. Immunité innée	57
I.1.A. Par les monocytes et les cellules dendritiques	57
I.1.B. Par les cellules NK	58
I.2. Immunité adaptative	60
I.2.A. Immunité adaptative à médiation cellulaire	60
I.2.A.1. Par les lymphocytes T CD8+	60
I.2.A.1.a. Primo-infection chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse	60
I.2.A.1.b. Primo-infection chez les patients asymptomatiques	61
I.2.A.1.c. Après la primo-infection.....	61
I.2.A.2. Par les lymphocytes T CD4+	62
I.2.A.2.a. Primo-infection chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse	62
I.2.A.2.b. Après la primo-infection	63
I.2.B. Immunité adaptative à médiation humorale	64
I.2.B.1. Chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse.....	64
I.2.B.2. Lors de l'infection persistante.....	65
I.2.B.3. Cas particuliers	66
II/ Rupture de l'équilibre hôte/virus	67
II.1. Cancers solides et lymphoproliférations liés à l'EBV	67
II.1.A. Cancers solides liés à l'EBV	68
II.1.A.1. Carcinome gastrique	68
II.1.A.2. Carcinome nasopharyngé.....	68
II.1.B. Lymphoproliférations liées à l'EBV	69
II.1.B.1. Chez les hôtes immunocompétents	69
II.1.B.1.a. Le lymphome de Burkitt.....	69

II.1.B.1.b. Le lymphome B Diffus à Grandes Cellules.....	71
II.1.B.1.c. Le lymphome de Hodgkin	72
II.1.B.1.d. La granulomatose lymphomatoïde	72
II.1.B.2. Chez les hôtes présentant des déficits immunitaires	73
II.1.B.2.a. Déficits Primaires	73
II.1.B.2.a.1. Défauts héréditaires de cytotoxicité des lymphocytes T CD8 ⁺ et des cellules NK	73
II.1.B.2.a.2. Défauts héréditaires de la signalisation des lymphocytes T et de l'interaction entre cellules B et T	76
II.1.B.2.b. Déficits acquis	84
II.1.B.3.b.1. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation.....	85
II.1.B.3.b.2. Lymphomes des patients atteints par le SIDA	86
II.2. Facteurs cellulaires favorisant l'émergence et le développement des tumeurs	87
II.2.A. Via les exosomes	87
II.2.C. Via l'IL-10.....	89
II.2.C.1. IL-10 chez les patients atteints de cancers liés à l'EBV.....	90
II.2.C.2. IL-10 et immunosuppression	91
II.2.D. Via le TGF-beta1	92
II.2.E. Via PD-L1	93
Partie 3 : Les cellules B régulatrices (Bregs)	97
I/ Historique de la découverte des Bregs	97
II/ Identification des sous-types de Bregs humains	98
II.1. Cellules B immatures	98
II.2. Cellules B10.....	99
II.3. Cellules B GrB+.....	100
II.4. Cellules Br1.....	100
II.5. Plasmablastes régulateurs.....	100
II.6. Cellules CD39 ⁺ CD73 ⁺	101
II.7. Bregs induites.....	101
II.8. tBregs	101
III/ Origine des Bregs	102
IV/ Induction des Bregs	103
IV.1. Par le CD40 et le BCR.....	103
IV.2. Par les TLRs	103
IV.3. Par l'Interleukine-21	104
V/ Mécanismes d'action des Bregs.....	105
V.1. Par des facteurs solubles	105
V.1.A. L'interleukine-10.....	105
V.1.B. Le TGF-beta	106

V.1.C. L'interleukine-35.....	106
V.2. Par l'enzyme Indoléamine 2,3-Dioxygénase	106
V.3. Par l'axe PD-1/PD-L1	107
V.4. Par induction de lymphocytes T régulateurs	108
VI/ Les Lymphocytes T Régulateurs	109
VI.1. Historique de la découverte des Tregs.....	109
VI.2. Origine des Tregs.....	110
VI.3. Différentes classes de Tregs	111
VI.3.A. Les lymphocytes T régulateurs naturels.....	111
VI.3.B. Les lymphocytes T régulateurs ICOS ⁺	111
VI.3.C. Les lymphocytes T régulateurs induits.....	112
VI.3.D. Les lymphocytes T producteurs d'IL-35.....	112
VI.3.E. Les cellules T régulatrices de type 1	113
VI.3.F. Les lymphocytes T régulateurs FoxP3 ⁺ producteurs d'IL-17	113
VI.3.G. Les lymphocytes T régulateurs CD8 ⁺	113
VII/ Pathologies associées aux Bregs.....	116
VII.1. Maladies auto-immunes et inflammatoires.....	116
VII.1.A. Le Lupus Erythémateux Disséminé	116
VII.1.B. La Polyarthrite Rhumatoïde	117
VII.1.C. La Sclérose En Plaques	118
VII.1.D. La maladie Inflammatoire de l'Intestin.....	120
VII.1.E. Le diabète insulino-dépendant.....	121
VII.1.F. Le pemphigus	121
VII.1.G. Les maladies allergiques.....	122
VII.1.H. La maladie chronique du greffon contre l'hôte.....	122
VII.2. Cancers	123
VII.3. Maladies infectieuses	124
VII.3.A. Par les helminthes	125
VII.3.B. Par les protozoaires	125
VII.3.C. Par les bactéries	126
VII.3.D. Par les virus	126
Chapitre II : Objectifs de la thèse.....	129
Chapitre III : Résultats.....	133
Partie 1 : Article	135
I/ Introduction	137
II/Article	139
III/ Conclusion.....	177

Partie 2 : Etude des mécanismes moléculaires sous-jacents à la surexpression des molécules immunosuppressives IL-10, TGF-β1 et IL-35.....	179
I/ Introduction	181
II/ Matériels et Méthodes.....	182
II.1. Culture cellulaire et traitements chimiques	182
II.2. Extraction d'ARN au trizol	183
II.3. Rétrotranscription des ARNs	183
II.4. Analyse du niveau de transcription par PCR quantitative en temps réel.....	183
III/ Résultats préliminaires	185
III.1. Régulation positive de l' <i>IL-10</i> par NF- κ B et c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV	185
III.1.A. Inhibition de NF- κ B avec le PHA-408.....	185
III.1.B. Inhibition de c-Myc avec 10058-F4	186
III.2. Régulation positive de l' <i>IL-35</i> par NF- κ B et partiellement négative par c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV	187
III.2.A. Inhibition de NF- κ B avec le PHA-408.....	188
III.2.B. Inhibition de c-Myc avec 10058-F4	189
III.3. Régulation négative de <i>TGF-β1</i> par NF- κ B et c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV	191
III.3.A. Inhibition de NF- κ B avec le PHA-408.....	191
III.3.B. Inhibition de c-Myc avec le 10058-F4	192
IV/ Discussion	195
Chapitre IV : Discussion générale, perspectives et conclusions.....	197
I/ Discussion générale et perspectives	199
I.1. Primo infection par l'EBV et lymphocytes B régulateurs	199
I.2. LMP1 au cœur des processus oncogéniques	200
I.3. Equilibre entre cytokines immunosuppressives et pro-inflammatoires	201
I.4. Différents types de Bregs et cellules B en latence III de l'EBV, quels facteurs transcriptionnels ?	202
I.5. Expansion des lymphocytes T régulateurs médiée par l'axe PD-1/PD-L1	203
I.6. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T autologues.....	203
I.7. Lymphocytes T autologues spécifiques de l'EBV ?.....	204
I.8. Place des Bregs dans les infections virales chroniques	205
I.9. Homologie des cellules B en latence III de l'EBV avec les Bregs dans un contexte tumoral	206
II/ Conclusion	208
Références bibliographiques	211

Avant-propos

Le point majeur de notre travail a consisté en l'étude du pouvoir immunorégulateur des cellules B en latence III de l'EBV (virus d'Epstein-Barr) en prenant comme cadre de référence les cellules B régulatrices.

Le document comprend quatre chapitres.

Le premier est une introduction bibliographique et se divise en trois parties. Dans la première, nous exposons brièvement quelques généralités sur les herpèsvirus. Les structures du virion et du génome de l'EBV sont succinctement présentées par la suite, de même que le cycle biologique de l'EBV : cycle lytique et latence virale. La physiopathologie de l'infection par l'EBV est détaillée dans cette sous-partie. Elle comprend les cellules-cibles conventionnelles et non conventionnelles du virus, ainsi que l'infection par l'EBV *in vivo* durant l'infection primaire et la persistance virale. La latence III étant au cœur de notre étude, une partie conséquente est consacrée à la présentation des protéines et ARNs viraux concernés, ainsi qu'aux caractéristiques phénotypiques des cellules infectées et du détournement de leurs voies de signalisation.

La seconde partie est consacrée à la réponse immune anti-EBV (essentiellement lors de la latence III) et aux événements pouvant conduire à la rupture de l'équilibre hôte/virus. Nous décrivons de manière détaillée les acteurs du système immunitaire inné et adaptatif de l'hôte responsables de l'immunosurveillance de l'EBV ainsi que les conséquences de la rupture de cet équilibre. Les pathologies liées à l'EBV y sont abordées, d'une part chez les hôtes immunocompétants et d'autre part chez ceux présentant des déficits immunitaires primaires (d'origine génétique) ou acquis.

Les lymphocytes B régulateurs (Bregs) font l'objet de la troisième partie bibliographique. Cette dernière comprend l'historique de leur découverte, leur classification et leurs fonctions biologiques. Les principales pathologies associées à leur déficit ou à leur surnombre sont également détaillées.

Le second chapitre précise les objectifs de la thèse. Il resitue la problématique de l'étude en fonction des travaux antérieurs du laboratoire et des données bibliographiques qui ont conduit à notre hypothèse de travail.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans un troisième chapitre et se découpe en deux parties. La première fait l'objet d'un article scientifique soumis au journal *Haematologica*. Il présente les résultats sur les homologues phénotypiques et fonctionnelles des cellules B en latence III de l'EBV avec les cellules B régulatrices. Les questionnements majeurs découlant de la discussion et les perspectives de cette étude sont abordés à la suite de l'article. Dans la seconde partie, nous exposons les résultats préliminaires concernant les mécanismes moléculaires sous-jacents à la surexpression des molécules immunosuppressives des Bregs par les cellules B en latence III de l'EBV. Ces résultats font l'objet d'une discussion spécifique.

Dans le quatrième et dernier chapitre, une discussion générale complémentaire de celle déjà réalisée dans la partie résultats est effectuée. Elle permet d'appréhender le sujet d'une manière plus globale et d'apporter des éléments de discussion complémentaires. Elle permet de plus d'aborder les perspectives de ce travail et les méthodologies envisagées.

Chapitre I : Introduction bibliographique

Partie 1 : Le virus d'Epstein-Barr

La famille des Herpesviridae

La famille des *Herpesviridae*, ou Herpèsvirus se compose de plus de 200 membres qui peuvent infecter différentes classes telles que les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les poissons et les bivalves. Conventionnellement, la famille des *Herpesviridae* partage une structure virale commune. Ils sont caractérisés par un ADN bicaténaire de poids moléculaire élevé (150 000 à 230 000 paires de bases), codant pour un grand nombre de protéines. Le génome viral est entouré d'une capsidie icosaédrique, composée de 162 capsomères. Ils possèdent une enveloppe dérivée de la membrane nucléaire, ainsi que des protéines à leur surface (**Figure 1**).

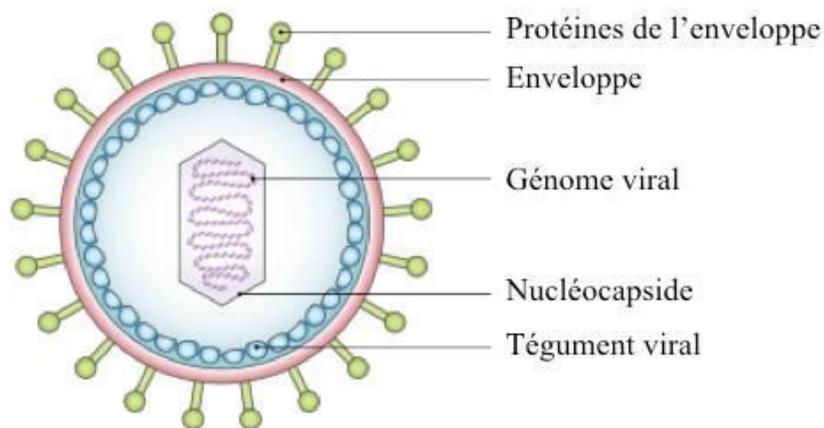


Figure 1 : Structure commune des *Herpesviridae*.

La famille des *Herpesviridae* possède une enveloppe, comprenant des protéines à sa surface. Le génome viral est contenu dans la nucléocapside. Le tégment viral, autrement appelé matrice virale, est un ensemble de protéines situées entre l'enveloppe et la nucléocapside de tous les Herpèsvirus. Modifié d'après <http://www.boogordocor.com/cold-and-flu-prevention>.

Etymologiquement, herpès signifie en grec ramper comme un serpent. Suite à la primo-infection, ces virus demeurent en « dormance » au sein de l'organisme hôte. Cette infection latente les protège du système immunitaire et des médicaments antiviraux. Ils deviennent des constituants de l'organisme de l'hôte après l'infection primaire. Suite à des stimuli extérieurs, tels que le stress, les *Herpesviridae* peuvent être réactivés, donnant lieu à une réinfection endogène, que l'on appelle la récurrence (**Figure 2**).

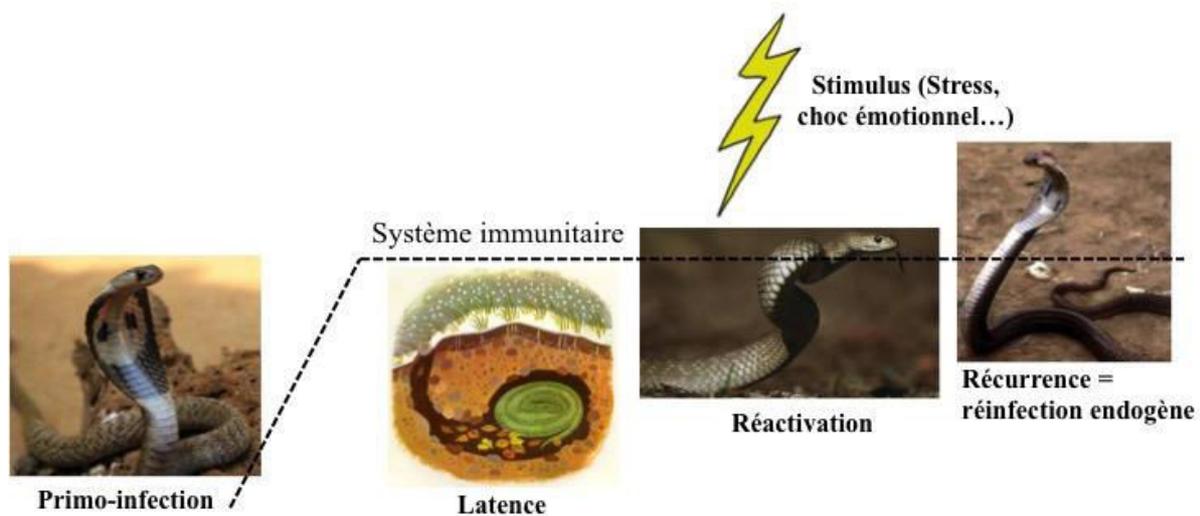


Figure 2 : Déroulement des infections par les Herpèsvirus.

Après la primo-infection, les virus sont présents sous leur forme latente, ce qui leur permet de persister au sein de l'organisme de l'hôte sans être repérés par le système immunitaire. Lors de stimuli extérieurs, tels que le stress ou un choc émotionnel, les virus peuvent être réactivés et générer une réinfection endogène, appelée récurrence. Cette phase est placée sous le contrôle du système immunitaire de l'hôte.

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 90% de la population humaine est infectée par des *Herpesviridae*. L'infection par ces virus peut causer différents types de maladies : herpès oral ou génital, conjonctivite, eczéma et bien d'autres. À ce jour, neuf types d'herpèsvirus ont été identifiés chez l'Homme : le virus de l'herpès, ou Herpès Simplex Virus (HSV) de type 1 ou 2 (HSV-1 ; HSV-2), le virus de la varicelle et du zona ou Herpès Virus Varicellae (VZV), le Cytomégalovirus (CMV), le Virus d'Epstein-Barr (EBV), et les 6ème, 7ème, et 8ème Herpès Virus Humains (HHV-6, HHV-7 et HHV-8). La famille des *Herpesviridae* est sous-divisée en trois groupes : les alpha-, beta-, et gamma-herpès virus (Kukhanova et al., 2014; Leroy et al., 2016). Le **Tableau 1** regroupe les différentes classes des herpèsvirus humains.

α-herpès virus	β-herpès virus	γ-herpès virus
Herpès Virus Simplex de Type 1 (HSV-1)	Cytomégalovirus (CMV)	Virus d'Epstein-Barr (EBV)
Herpès Virus Simplex de Type 2 (HSV-2)	Herpès Virus Humain de type 6 (HHV-6)	Herpès Virus Humain de type 8 (HHV-8)
Herpès Virus Varicellae (VZV)	Herpès Virus Humain de type 7 (HHV-7)	

Tableau 1 : Différents groupes des *Herpesviridae* chez l'Homme

À l'exception du VZV, le mode de transmission des Herpèvirus chez l'Homme s'effectue par contacts interhumains rapprochés oraux ou sexuels. Le VZV est transmis par voie respiratoire. Le CMV se transmet essentiellement par la salive, mais peut également être véhiculé par voie sanguine.

II/ Découverte originelle et historique du virus de l'EBV

En 1958, le chirurgien britannique Denis Burkitt fut le premier à décrire un type de tumeur communément retrouvé chez les enfants d'Afrique de l'Est (Burkitt, 1958). Ces tumeurs agressives, nommées par la suite lymphomes de Burkitt, étaient causées par la multiplication incontrôlée des globules blancs.

En 1961, D. Burkitt donna une conférence à ce sujet et rencontra Anthony Epstein, qui était particulièrement intéressé par la compréhension des maladies grâce aux expérimentations en laboratoire. Il était spécialisé dans la microscopie électronique. En 1964, A. Epstein et son étudiante, Yvonne Barr découvrirent le virus d'Epstein-Barr, suite à l'établissement de lignées issues de lymphomes de Burkitt observées en microscopie électronique (**Figure 3**). Ce nouveau virus fut nommé Epstein-Barr virus (EBV), il représenta le premier virus humain associé à une tumeur (Epstein et al., 1964).

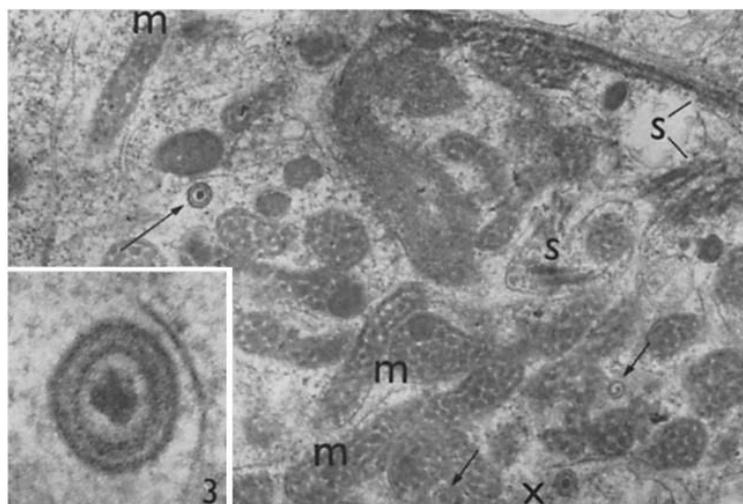


Figure 3 : Particules de l'EBV observées en microscopie électronique.

m : mitochondrie altérée; s : microtubules. D'après (Epstein et al., 1964).

Grâce à des études en microscopie, Werner et Gertrude Henle découvrirent qu'un certain type de globules blancs, les lymphocytes B, étaient capables de transmettre le virus à d'autres cellules B non infectées et de les rendre cancéreuses (Henle and Henle, 1966).

Afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'EBV et le lien aux lymphomes de Burkitt, une large étude a été menée en 1972 à partir d'échantillons de 42 000 enfants originaires d'Ouganda. Durant cette période, de Thé et ses collaborateurs ont pu démontrer que la modification sérologique des patients avait un lien avec le développement des tumeurs (De-Thé, 1972). Le dernier indice du mystère est apparu en 1976, lorsque des scientifiques suédois ont étudié les chromosomes dans des cellules de tumeurs de lymphome de Burkitt. Ils remarquèrent que la même partie du chromosome 8 était remanié au chromosome 14 dans toutes les cellules. Il s'est avéré que cette partie de chromosome contenait *C-MYC*, un proto-oncogène. Nishikura et al ont montré que la combinaison de l'EBV avec l'erreur génétique augmente considérablement le risque de développement de lymphomes de Burkitt (Nishikura et al., 1983).

A l'aide des outils moléculaires qui se sont développés au cours des années, les chercheurs ont constaté en 1991 que l'infection par l'EBV était fortement corrélée aux cancers nasopharyngés (NPC) (Vonsover et al., 1991). Ils ont également identifié un sous-type particulier du cancer de l'estomac, qui avait des caractéristiques similaires aux NPC. Lors des expériences, quasiment tous les échantillons étaient positifs pour l'EBV (Shibata et al., 1991).

Depuis, l'EBV a été décrit dans de nombreux cancers, tels que les lymphomes non Hodgkiniens (LNH), Hodgkiniens (LH), les désordres lymphoprolifératifs post transplantation (PTLD), les lymphomes des cellules T/NK... (Ko, 2015). Les principales maladies associées à l'EBV sont décrites dans la section « Désordres lymphoprolifératifs liés à l'EBV ».

III/ Structure du virion

Le virion de l'EBV mesure entre 120 et 200 nm de diamètre. Comme tous les membres des *Herpesviridae*, ce virus possède un ADN double brin linéaire, enroulé autour de protéines basiques. Cet ensemble constitue le core. Le core est protégé par une structure protéique icosaédrique : la capside. Cette capside est composée de 162 capsomères et entourée d'une bicouche lipidique : l'enveloppe, qui comporte des glycoprotéines. Elle est acquise lors du bourgeonnement cellulaire à la fin du cycle lytique et joue un rôle essentiel dans la phase précoce de l'infection, grâce à la glycoprotéine virale gp350/220. Étant donné que l'enveloppe est composée de lipides, elle peut être fragilisée par les acides, les détergents et certains solvants. Si l'enveloppe de l'EBV est endommagée, le virion ne peut plus se

propager et perd son caractère infectieux. Le tégment se situe entre la capside et l'enveloppe, il contient des protéines virales et des enzymes nécessaires à sa multiplication.

IV/ Structure du génome

Le génome est constitué d'un ADN bicaténaire de 172 Kpb. Il est composé de séquences terminales répétées (TR) de 500 pb, ainsi que de quatre séquences internes répétées (IR1 à IR4) (Young et al., 2007). IR1 constitue une zone importante de répétitions internes, d'une taille de 3 Kpb. Cette séquence interne répétée sépare le génome de l'EBV en deux séquences distinctes : une séquence unique courte (U_s : Unique Short), comprenant la région U1, et une séquence unique longue (U_L : Unique Long) de 150 Kpb, composée des régions U2 à U5. L'origine de réplication (OriP) est fonctionnelle durant la phase de latence, tandis que les deux origines de réplication lytiques (OriLyt) le sont durant le cycle lytique de l'EBV (*Figure 4*).

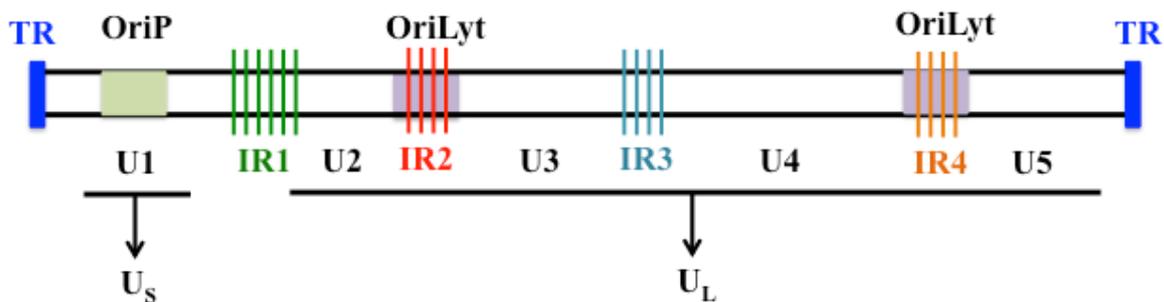


Figure 4 : Représentation schématique du génome de l'EBV sous sa forme linéaire.

TR : Répétition Terminale; IR : Répétition interne; U : Région unique; OriP : origine de réplication latente ; OriLyt : origine de réplication lytique.

Quatre promoteurs (Cp, Wp, Fp et Qp) régissent l'expression des protéines Epstein-Barr Nuclear Antigens (EBNAs) au niveau du génome de l'EBV. L'expression transcriptionnelle de ces protéines conditionne l'état du cycle (lytique, en latence) de l'EBV au sein des cellules immortalisées par le virus (*Figure 5*).

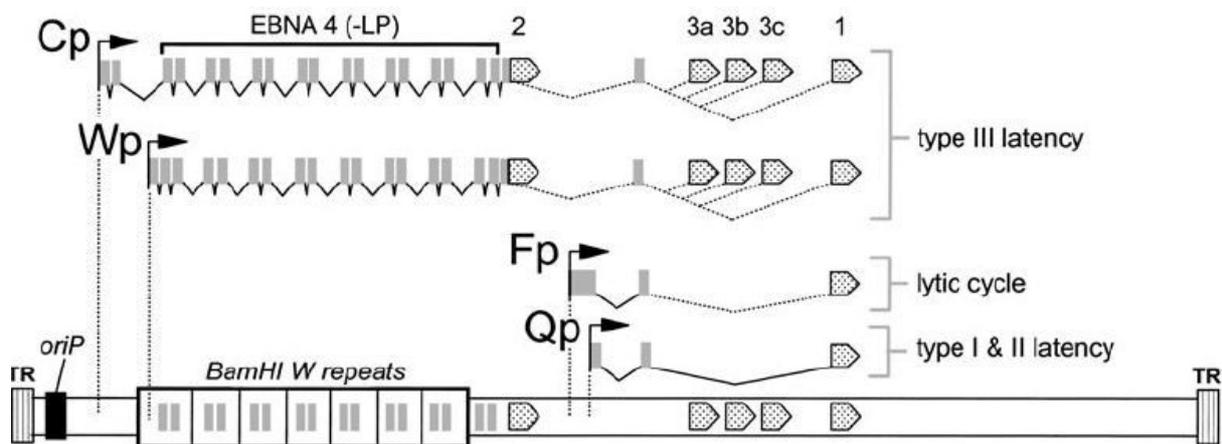


Figure 5 : Localisation des promoteurs Cp, Wp, Fp et Qp au sein du génome de l'EBV.

Structure des transcrits des protéines EBNA observées durant les différentes phases de l'EBV. La latence III de l'EBV inclue l'expression des six protéines EBNA (EBNA1, 2, 3a, 3b, 3c, LP), générées par l'épissage alternatif des longs transcrits primaires initiés à partir des promoteurs Cp et Wp. Durant les latences I et II (restreintes), seule la protéine EBNA1 est exprimée, elle est transcrite à partir du promoteur Qp. Fp est le promoteur du cycle lytique situé en amont de Qp. BamHI W repeats correspond à la région IR1. OriP est l'origine de réplication épisomale associée au programme de latence. TR : Terminal Repeat. D'après (Paulson et al., 2002).

L'EBV a été le premier herpèsvirus dont le génome a été entièrement cloné dans *Escherichia Coli* (Dambaugh et al., 1980). Il a été séquencé entièrement quelques années plus tard (Baer et al., 1984). Le séquençage a permis d'identifier plusieurs cadres de lecture ouverts (ORFs : Open Reading Frames). Le génome de l'EBV a été séquencé par segments après digestion de son ADN par l'enzyme de restriction BamHI. Les ORFs, les gènes, les sites de régulation et les sites de transcription font référence à ces fragments d'ADN digérés par cette même enzyme de restriction (préfixe BamHI).

Lorsque l'EBV infecte une cellule cible, son génome peut se circulariser sous forme d'épisome grâce aux séquences terminales TR. Cette forme épisomale circulaire peut persister dans les cellules cibles tout au long de la vie de l'hôte de manière constante (phase de latence). Le virus peut être réactivé et produire à nouveau des virions en réponse à des stimulations de l'environnement de la cellule infectée. Le génome de l'EBV sous sa forme épisomale est représenté en **Figure 6**.

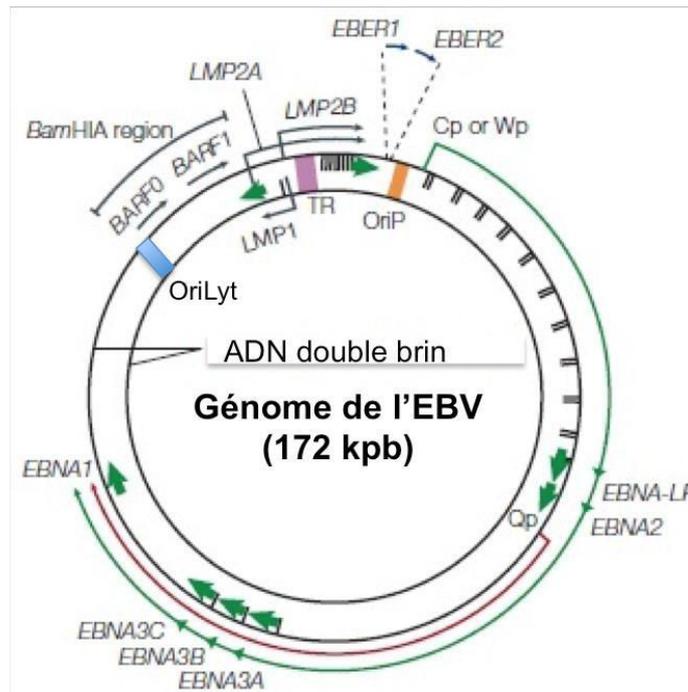


Figure 6 : Structure du génome de l'EBV sous sa forme épisomale.

Les flèches vertes correspondent aux régions codantes des protéines de latence EBNA (Epstein-Barr Nuclear Antigens): EBNA-LP ; -1 ; -2 ; -3A ; -3B et -3C. Les flèches bleues représentent les ARNs transcrits non traduits EBER (EBV-Encoded RNA) -1 et -2. LMPs (Latence Membrane Proteins) -1 ; -2a et -2b sont les protéines membranaires de latence. BARF0 (BamHI-A Rightward Frame 0) et BARF1 (BamHI-A Rightward Frame 1) font partie de la région BamHIA. Cp, Wp et Qp sont les promoteurs du génome. OriP correspond à l'origine de répllication latente. OriLyt : origine de répllication lytique. TR : Terminal Repeat. Modifié d'après (Young and Rickinson, 2004).

V/ Cycle biologique de l'EBV

L'EBV passe la barrière oropharyngée constituée de cellules épithéliales, ce qui permet l'infection des cellules B naïves sous-jacentes. L'EBV peut alors se trouver dans deux états suite à l'infection des cellules hôtes : en cycle lytique ou en phase de latence. Le cycle lytique constitue la phase de répllication du virus. Un grand nombre de gène est alors exprimé, le génome étant sous sa forme linéaire. Comme précédemment décrit, le génome peut également se circulariser sous forme d'épisome et l'EBV passer en phase de latence. Durant ce programme, le nombre de gènes exprimés est restreint. Le virus peut être épisodiquement réactivé suite à des stimuli extérieurs (TGF-beta, hypoxie, stress...), permettant à nouveau la production de virions qui pourront infecter d'autres cellules-cibles (*Figure 7*).

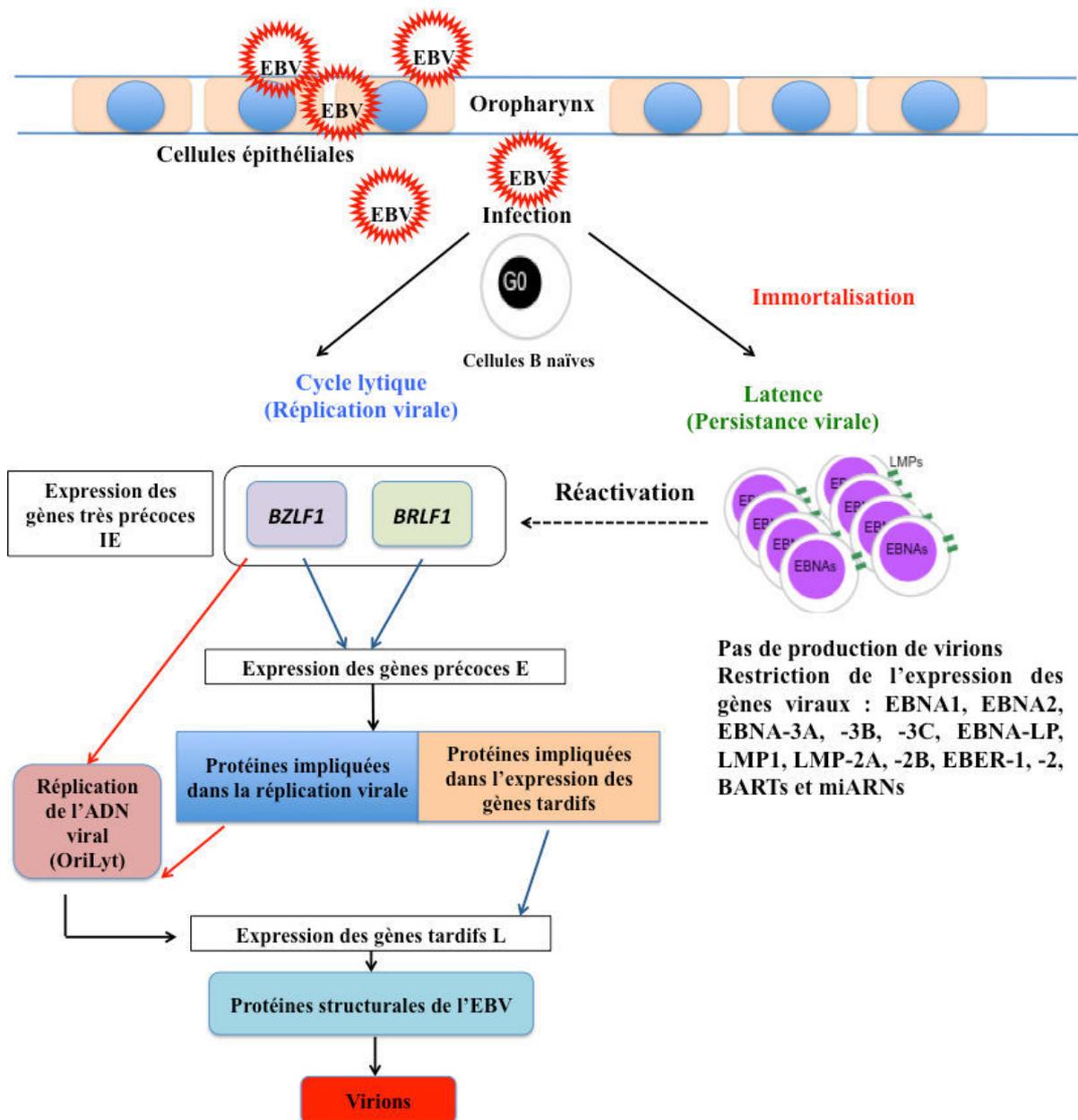


Figure 7 : Schéma représentant le cycle biologique de l'EBV.

L'EBV passe la barrière oropharyngée constituée de cellules épithéliales, pour infecter les cellules B naïves sous-jacentes. Suite à l'infection des cellules B, le virus peut être en cycle lytique ou en latence virale. Le cycle lytique correspond à la phase de réplication du virus. Les gènes très précoces IE (Immediate Early) *BZLF1* et *BRLF1* sont exprimés dans un premier temps, ils permettent la réplication de l'ADN viral *via* les origines de réplication lytiques OriLyt, et induisent l'expression des gènes précoces E (Early). L'expression des gènes précoces permet la sécrétion (i) des protéines impliquées dans la réplication virale, permettant la réplication de l'ADN viral et (ii) des protéines jouant un rôle dans l'expression des gènes tardifs L (Late). Après réplication de l'ADN de l'EBV, les gènes tardifs sont exprimés. Ils codent pour les protéines structurales de l'EBV, conduisant à la production de virions pouvant infecter d'autres cellules-cibles. Le programme de latence permet la persistance du virus tout au long de la vie de l'hôte. Cette phase est caractérisée par la non production de virions et l'expression restreinte des gènes de latence : les protéines nucléaires EBNA, les protéines de la membrane LMP, les ARNs non codants EBERs, les BARTs et les micro-ARNs. IE : Immediate Early ; E : Early ; OriLyt : Origine de réplication lytique ; L : Late ; EBNA : Epstein-Barr Nuclear Antigen ; LMP : Latent Membrane Protein ; EBER : EBV-encoded RNA ; miARNs : micro-ARNs. Inspiré d'après (CIRI).

Les paragraphes suivants résument les différentes étapes du cycle lytique et les programmes de latence de l'EBV.

V.1. Le cycle lytique

V.1.A. Lors de la primo-infection

Le cycle lytique correspond à la phase de réplication du virus, celui-ci pouvant infecter les cellules épithéliales et les cellules B naïves. Cette phase est nécessaire pour l'expansion du pool de cellules B infectées et pour la transmission horizontale du virus (Miller and El-Guindy, 2002, revue).

Lors de cette phase, les deux gènes viraux très précoces (IE : Immediate Early) viraux, *BZLF1* (Zta, Z, ZEBRA, EB1) et *BRFL1* (Rta, R, EB2) sont tout d'abord exprimés. Ces deux gènes codent pour des activateurs transcriptionnels et induisent l'expression de gènes précoces (E : Early), tels que la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase (*BALF5*), *BMRF1* et la protéine de liaison à l'ADN simple brin *BALF2*. L'EBV, par le biais de ces enzymes et de ces protéines, peut se répliquer. La réplication virale se produit dans des sites particuliers du noyau, appelés compartiments de réplication (Daikoku et al., 2005; Sugimoto et al., 2011). La réplication efficace de l'ADN viral dans les cellules nécessite sept protéines virales : *BZLF1*, *BALF5*, *BMRF1*, *BALF2*, *BBLF4*-*BSLF1*-*BBLF2/3* ainsi que certains facteurs cellulaires, tels que les kinases cycline-dépendantes, les facteurs de réparation de l'ADN, les protéines chaperonnes et les isomérases (Kawashima et al., 2013; Kudoh et al., 2003, 2009; Narita et al., 2013).

La réplication est suivie d'une transcription efficace de gènes tardifs (L : Late) codant pour des protéines structurales virales, telles que la protéine majeure de la capsid, l'antigène de la capsid virale et les glycoprotéines. Les gènes L ne sont exprimés qu'après la réplication de l'ADN viral, et impliquent au minimum cinq gènes précoces E : *BcRF1*, *BVLF1*, *BDLF3.5*, *BDLF4*, *BGLF3* (Murata, 2014, revue). Il s'ensuit le clivage du génome viral pour former un ADN linéaire. Les nucléocapsides entrent dans la membrane nucléaire, sont transférées dans le cytoplasme. Elles sont enveloppées avec des protéines du tégument à l'intérieur de la membrane et avec des glycoprotéines à la surface afin de former une particule virale (**Figure 8**).

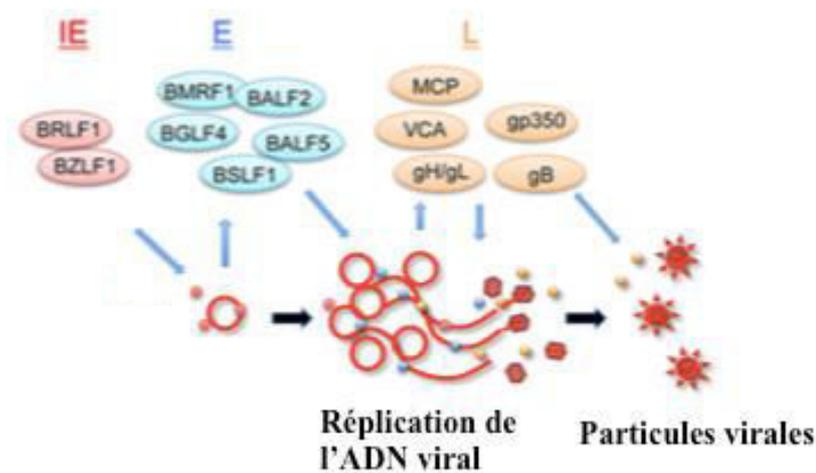


Figure 8 : Schéma illustrant le cycle de réplication lytique de l'EBV.

L'expression des deux gènes très précoces IE *BRLF1* et *BZLF1* induit l'expression de gènes E, tels que *BMRF1* et *BALF5*. Les protéines codées par les gènes E permettent la réplication de l'ADN viral. Par la suite, les gènes L sont exprimés, permettant l'expression des protéines de la capside et les glycoprotéines et la formation de nouvelles particules virales. IE : Immediate Early ; E : Early ; L : Late. Modifié d'après (Murata, 2014).

V.1.B. Facteurs favorisant la réactivation virale

Les deux gènes IE *BZLF1* et *BRLF1* jouent un rôle essentiel dans le passage de la latence au cycle lytique (Countryman and Miller, 1985; Countryman et al., 1987; Hardwick et al., 1988). Grogan et al ont montré que la protéine Z, EB Replication Activator (ZEBRA), codée par le gène *BZLF1*, active le passage de la latence au cycle lytique (Grogan et al., 1987). Selon les auteurs, la transfection des lymphocytes B par un vecteur permettant l'expression de ZEBRA est suffisante pour activer le cycle lytique (Grogan et al., 1987) (*Figure 9*).

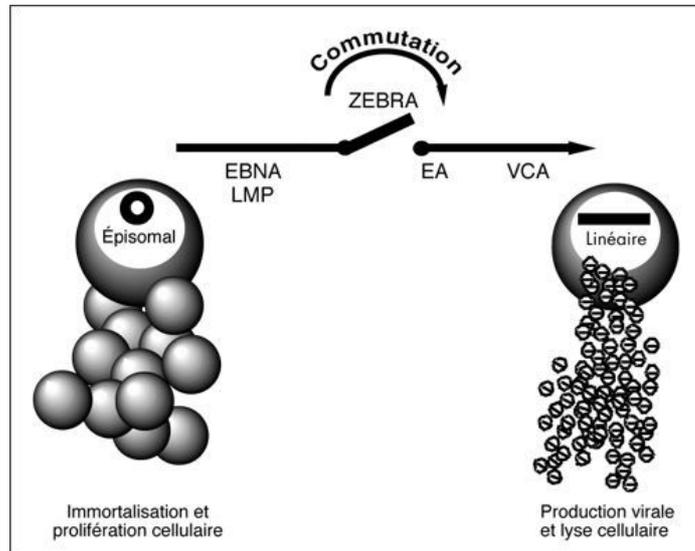


Figure 9 : Passage de la phase de latence au cycle lytique par la protéine ZEBRA de l'EBV.

La protéine ZEBRA, codée par le gène *BZLF1*, permet la commutation de la phase de latence au cycle lytique. Elle permet l'expression des protéines précoces du cycle (EA : Early Antigens) et par la suite des protéines de la capsid virale (VCA : Viral Capsid Antigen). Le génome de l'EBV passe de la forme épisomale à la forme linéaire, permettant la production de virions et la lyse cellulaire. D'après (Seigneurin, 1997).

La protéine ZEBRA active l'expression de Rta (R transactivator), protéine codée par le gène *BRLF1*. Les protéines ZEBRA et Rta agissent de manière synergique pour activer le cycle lytique viral (Ragoczy et al., 1998).

Les évènements moléculaires sous-jacents à la commutation de la phase de latence au cycle lytique sont généralement étudiés dans les lignées lymphoblastoïdes ou dans des lignées issues de lymphomes. Des stimuli exogènes sont capables de déclencher la commutation. Ceux-ci incluent les agonistes de la protéine kinase C (PKC) tels que les esters de phorbol, les anti-immunoglobulines, le TGF- β et des agents déméthylants comme l'azacytidine. La capacité de tous ces agents à induire le cycle lytique dépend du type cellulaire dans lequel l'EBV se trouve (Gradoville et al., 2002).

V.2. La latence virale

La latence virale est caractérisée par l'expression d'un nombre réduit de gènes, permettant la persistance virale. Il existe cinq types de latence : la latence 0, 1, 2, 3 et la latence atypique. Les différents états de latence de l'EBV sont caractérisés par des profils d'expression des gènes de latence (**Figure 10**).

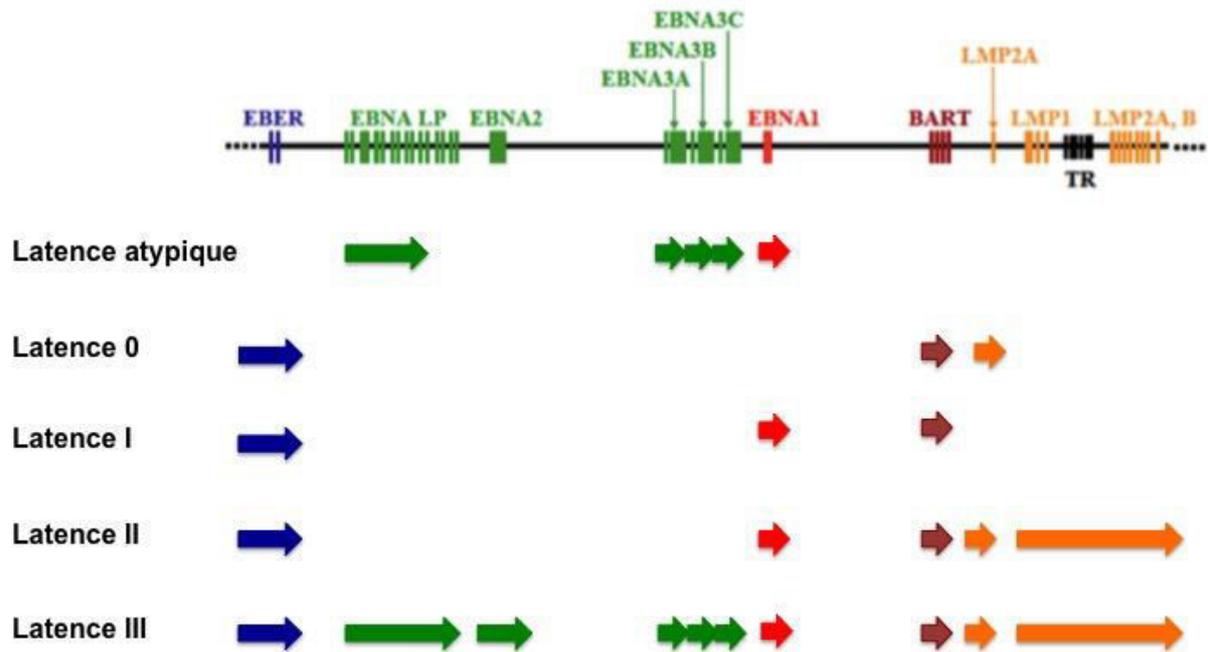


Figure 10: Profil d'expression des gènes de latence de l'EBV en fonction des différents types de latence.

EBER : Epstein-Barr Virus (EBV)-encoded small RNA. EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, LP (Leader Protein) : Epstein-Barr Nuclear Antigen. LMP1, 2A, 2B : Latent Membrane Protein. TR : Terminal Repeat. Les flèches correspondent à l'expression des gènes et des ARNs cités en haut de la figure. Inspiré d'après (Young, Dawson, and Eliopoulos 2000, revue).

V.2.A. Latence III

La latence III est le programme d'immortalisation de l'EBV lorsqu'il infecte les lymphocytes B durant la primo-infection. Les promoteurs Cp et Wp initient l'expression de l'ensemble des protéines de la latence III. Ce programme est caractérisé par l'expression de l'ensemble des protéines de latence et des ARNs viraux. La protéine nucléaire Epstein-Barr Nuclear Antigen 2 (EBNA2) est directement responsable de l'initiation de la transcription de la majorité des gènes codant pour les protéines de la latence III (Rowe et al., 2014, revue). Cette latence est associée à différents types de lymphomes, incluant les troubles lymphoprolifératifs chez les sujets immunodéprimés, tels que les post-transplantés (PTLD) ou les patients atteints du Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) (Tse and Kwong, 2015, revue).

Les cellules B immortalisées par le virus *in vitro* conduisent à l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs), qui sont également en latence III de l'EBV (Iwakiri et al., 2006, revue). Le rôle des protéines virales exprimées lors de la latence III, les caractéristiques phénotypiques et les voies de signalisation détournées durant cette phase seront décrits de manière précise dans la section « Caractéristiques des cellules en latence III de l'EBV ».

V.2.B. Latence II

La latence II de l'EBV est définie par l'expression des LMPs et l'expression de EBNA1. Le promoteur Qp est à l'origine du profil d'expression des protéines en latence II. Cette latence est caractéristique des cellules tumorales issues des carcinomes nasopharyngés (NPC), de la maladie de Hodgkin (LH), et des cellules T/NK infectées par l'EBV (Mesri et al., 2014, revue).

L'oncoprotéine majeure de l'EBV, LMP1 est exprimée durant ce programme de latence. Les cytokines IL-4, -10, -13, -15 et -21 contribuent à l'activation de la transcription de LMP1, permettant la prolifération des cellules B immortalisées (Salamon et al., 2012). LMP2A est quant à elle nécessaire à la survie des lymphocytes B immortalisés (Mancao and Hammerschmidt, 2007).

Moralès et al ont mis au point un cocktail de peptides dérivés des protéines de latence exprimées en latence II de l'EBV, qui induisent une activité spécifique des lymphocytes T CD4⁺ cytotoxiques contre l'EBV (Moralès et al., 2012). Ces expériences ont été menées sur des cellules T immortalisées par l'EBV et sur des LCLs. Ils ont montré que ces peptides n'induisent pas de réponse médiée par les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Ce cocktail de peptides constitue une approche thérapeutique contre les tumeurs malignes en latence II de l'EBV (Moralès et al., 2012).

V.2.C. Latence I

Le programme de latence I est caractérisé par l'expression des EBERs, des BARTs, des microARNs des BARTs, et d'EBNA1 (Marquitz et al., 2014). Comme la latence II, le promoteur Qp est à l'origine du profil d'expression des protéines en latence I. Ce programme est associé aux cellules issues des lymphomes de Burkitt (LB) et du carcinome gastrique (CG) (Grywalska and Rolinski, 2015, revue).

EBNA1 est la seule protéine virale latente à être exprimée durant cette phase, elle est nécessaire pour la réplication et la ségrégation du génome viral (Frappier, 2012). Durant la mitose des lymphocytes B, EBNA1 ancre l'épisome à la chromatine, ce qui permet une ségrégation efficace. EBNA1 est également essentielle pour la survie des lymphocytes B, en empêchant la mort cellulaire. Les cellules en programme de latence I se situent au niveau du réservoir des cellules B mémoires et contribuent au maintien du génome viral sans être éliminées par le système immunitaire des hôtes immunocompétents (Frappier, 2012, revue).

V.2.D. Latence 0

Lors du programme de latence 0 de l'EBV, aucune protéine de latence n'est exprimée. Cette latence est caractérisée par l'unique expression des EBERs, des BARTs, et des transcrits de LMP2A (Babcock et al., 2000; Shaknovich et al., 2006). L'EBV peut échapper à la réponse immune anti-EBV, les ARNs de LMP2A étant peu immunogènes et non détectables par le système immunitaire de l'hôte (Robertson, 2010). Ces cellules peuvent résider dans le compartiment des cellules B mémoires tout au long de la vie de l'hôte sans être éliminées par le système immunitaire. Il n'existe pas de pathologie associée à ce type de latence.

V.2.E. Latence atypique

La lignée P3HR1 est issue d'un patient atteint de lymphome de Burkitt associé à l'EBV et a été caractérisée par Cho et son équipe (Cho et al., 1980). Le sous-type viral P3HR1 est un virus défectif qui présente une délétion dans son génome dans la région codant EBNA2 (King et al., 1982; Bornkamm et al., 1982a). La latence établie dans les cellules portant ce sous-type viral est caractérisée par l'expression des protéines EBNA1, EBNA-3A, -3B, -3C et une forme tronquée d'EBNA-LP.

Selon Kelly et *al*, ce type de virus est présent dans environ 15% des tumeurs primaires. Il co-existe avec un virus sauvage, et il induit l'expression des protéines sous le contrôle exclusif du promoteur viral Wp (d'où le nom donné de latence « Wp-restreinte »). Toutes les cellules en latence Wp-restreinte sont très résistantes à l'apoptose mais il existe des divergences entre les équipes concernant les causes de cette résistance (Kelly et al., 2002, 2006; Garibal et al., 2007).

V.3. Physiopathologie de l'infection par l'EBV

L'EBV est à l'origine de multiples pathologies, telles que les PTLDs, les lymphomes de Burkitt et Hodgkiniens, les lymphomes T/NK, les NPC et bien d'autres. Au vue de la diversité des maladies associées à l'EBV, les cibles de ce virus sont multiples. Les lymphocytes B et les cellules épithéliales en constituent les cibles « conventionnelles ». L'EBV peut également infecter d'autres types cellulaires, « non conventionnels », tels que les lymphocytes T, les cellules naturelles tueuses (NK) ou encore les monocytes.

V.1.A. Cellules-cibles de l'EBV

V.1.A.1. Cibles conventionnelles

V.1.A.1.a. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B sont les principales cibles de l'EBV. Les glycoprotéines virales jouent un rôle central dans l'entrée et l'internalisation de l'EBV dans les cellules hôtes. Cinq glycoprotéines de l'enveloppe virale et trois protéines cellulaires sont nécessaires pour l'entrée efficace de l'EBV au sein des lymphocytes B (Hutt-Fletcher, 2007). L'EBV se fixe au lymphocyte B grâce à la gp350/220, qui reconnaît spécifiquement le récepteur CD21/CR2 (Nemerow et al., 1987), avec une forte affinité (Moore et al., 1989). Cette étape permet l'activation du lymphocyte B et l'endocytose du virus (Tanner et al., 1987). Après endocytose du virus dans un compartiment au pH faible, la fusion des membranes virales et cellulaires se produit sous l'action d'un complexe de trois protéines. Ce complexe est composé d'un homotrimère de la glycoprotéine gB et d'un hétérodimère des glycoprotéines gH et gL. La cinquième glycoprotéine virale nécessaire pour l'entrée du virus est la protéine gp42, qui fonctionne plus efficacement sous sa forme clivée (Sorem et al., 2009). La gp42 se lie directement à gH (Wu and Hutt-Fletcher, 2007), qui induit le passage de la forme dimérique gHgL au complexe trimérique ghgLgp42. La fusion entre le lymphocyte B et le virus est également déclenchée par l'interaction entre le CMH de classe II et la glycoprotéine gp42 (Li et al., 1997). Au cours de l'infection, il y a expression des différentes protéines nucléaires et membranaires de l'EBV membranaires de l'EBV. La **Figure 11** représente ces différentes étapes, avec l'expression des différentes protéines de latence virale au cours du temps.

lymphocytes B au niveau de la lamina propria, se situant sous l'épithélium. L'infection des cellules épithéliales consiste en l'endocytose du complexe IgA/EBV (Sixbey and Yao, 1992). Une réplication virale active s'y produit (Sixbey et al., 1984).

Selon Molesworth et *al*, la glycoprotéine gH est essentielle pour la fixation et la pénétration du virus dans les cellules épithéliales en l'absence de CD21 (Molesworth et al., 2000). La glycoprotéine gp85 est essentielle pour l'infection des lymphocytes B. Elle est également déterminante pour la pénétration du virus au sein des cellules épithéliales (Oda et al., 2000). Borza et *al* ont montré qu'une forme soluble du complexe gHgL fabriquée par une bactérie peut se lier spécifiquement aux cellules épithéliales, et non aux lymphocytes B. Cette liaison peut être inhibée par un anticorps monoclonal spécifique du complexe gHgL (Borza et al., 2004).

La liaison de l'EBV aux lymphocytes B peut faciliter la liaison entre les lymphocytes B et les cellules épithéliales, avec pour conséquence l'entrée du virus au sein des cellules de l'épithélium. Ce processus est nommé transfert d'infection et se décline en trois étapes : (i) activation des molécules d'adhésion (ii) liaison entre les lymphocytes B infectés par l'EBV et les cellules épithéliales via les molécules d'adhésion (iii) interaction entre les glycoprotéines virales et les cellules épithéliales, entraînant la fusion et l'absorption des virions. L'infection des cellules épithéliales par les lymphocytes B infectés nécessite les glycoprotéines gH et gL, la gp42 n'étant pas essentielle lors de ce processus (Shannon-Lowe and Rowe, 2011, revue).

V.1.B.1. Cibles non conventionnelles

V.1.B.1.a. Les lymphocytes T

Kikuta et ses collaborateurs ont découvert pour la première fois des lymphocytes T CD4+ infectés par l'EBV chez un enfant atteint de la maladie de Kawasaki présentant des symptômes chroniques de mononucléose infectieuse (MNI) (Kikuta et al., 1988). Cette pathologie est la principale cause des maladies cardiaques acquises lors de l'enfance dans les pays développés. Selon Jones et *al*, l'EBV peut infecter les lymphocytes T et contribuer à la lymphomagenèse T chez certains patients atteints d'infection sévère par le virus (Jones et al., 1988).

En 1996, des lignées cellulaires T EBV-positives ont été établies à partir de lymphocytes issus du sang périphérique de patients atteints d'une infection sévère chronique

par l'EBV (Imai et al., 1996). Ces données prouvent que l'EBV est capable de cibler et d'infecter les lymphocytes T *in vivo*, ce qui conduit à une prolifération non contrôlée des lymphocytes T immortalisés (Imai et al., 1996). Montpellier et *al* sont parvenus à obtenir des lignées cellulaires de lymphocytes T immortalisés par l'EBV *in vitro*. Les cellules de ces lignées expriment les gènes de latence EBNA1 et LMP1 (Montpellier et al., 1997). Groux et son équipe ont découvert que les lymphocytes T transformés expriment les marqueurs CD2, CD3, CD4 ou CD8. La plupart de ces cellules présentent un phénotype de cellules T naïves et un réarrangement complet du TCR (Groux et al., 1997a).

Le récepteur à l'EBV, CD21/CR2 a été découvert à la surface de cellules T leucémiques (Toben and Smith, 1977), de cellules T périphériques (Fischer et al., 1991), de thymocytes (Tsoukas and Lambris, 1988; Watry et al., 1991), et de plusieurs lignées cellulaires lymphoblastoïdes T (Fingeroth et al., 1988).

Haverkos et *al* ont corrélé le taux élevé de copies d'ADN de l'EBV dans le sérum des patients atteints de lymphomes T périphériques et la mauvaise survie globale des sujets (Haverkos et al., 2017).

V.1.B.1.b. Les cellules NK

L'équipe de Kawa-Ha a mis pour la première fois en évidence l'implication des cellules NK dans le développement de la leucémie à grands lymphocytes granuleux (GLG) (Kawa-Ha et al., 1989).

Trempat et son équipe ont identifié que les cellules NK sont des cibles naturelles de l'EBV et que l'infection de ces cellules est un événement précoce observé lors de la primo-infection. Les auteurs émettent l'hypothèse que l'infection des cellules NK intervient lorsque ces cellules tentent de tuer une cellule infectée par l'EBV (Trempat et al., 2002). Lors de l'infection précoce de l'EBV chez les patients, les cellules NK attaquent les lymphocytes B autologues infectés par l'EBV (Tabiasco et al., 2003). *In vitro*, les cellules NK acquièrent de manière transitoire le CD21 des lymphocytes B, par transfert synaptique de quelques molécules réceptrices sur leur propre membrane. En présence de particules virales, une liaison peut s'effectuer, permettant à l'EBV d'infecter les cellules NK. Ce modèle suggère une possible voie d'entrée du virus au sein des cellules NK (Tabiasco et al., 2003).

V.1.B.1.c. Les monocytes

L'EBV a été retrouvé sous sa forme latente dans des lignées cellulaires monoblastiques issues de la moelle osseuse d'enfants présentant des défauts de maturation de l'hématopoïèse (Revoltella et al., 1989). D'après Gosselin et al., environ 20% des monocytes possèdent le CD21/CR2 à leur surface, ce qui peut constituer une voie d'entrée pour l'EBV (Gosselin et al., 1991). L'EBV inhibe fortement la production de TNF- α au sein des lignées monocytaires. Il peut interagir directement avec les monocytes et les macrophages pour exercer son effet immunomodulateur (Gosselin et al., 1991). Savard et ses collaborateurs ont également révélé la capacité de l'EBV à infecter ce type cellulaire, en observant les aptitudes du virus à infecter et à se répliquer au sein de monocytes humains fraîchement isolés (Savard et al., 2000). L'infection des monocytes par l'EBV réduit significativement leur capacité phagocytaire. L'ensemble des résultats de cette étude démontre que l'infection par l'EBV des monocytes et l'altération de leurs fonctions biologiques favorise la propagation virale durant les premiers stades de l'infection (Savard et al., 2000).

V.1.B. Infection par l'EBV in vivo et persistance virale

Plus de 95% de la population mondiale est infectée par l'EBV (McLaughlin-Drubin and Munger, 2008). La primo-infection par l'EBV survient généralement durant l'enfance, elle est asymptomatique dans la plupart des cas. Après l'adolescence, l'infection peut être responsable de la mononucléose infectieuse, une maladie lymphoproliférative bénigne (Niederman et al., 1968; Williams and Crawford, 2006).

Après avoir infecté les cellules B sous jacentes aux cellules épithéliales de l'oropharynx, le génome de l'EBV se circularise sous forme d'épisome et le virus peut entrer en programme de latence III. Les lymphocytes B infectés de façon latente se développent rapidement dans les zones extrafolliculaires des tissus lymphoïdes oropharyngés tels que les amygdales. Ces cellules B infectées peuvent être retrouvées dans le sang. Ces cellules migrent ensuite vers les centres germinatifs, où elles passent à un programme de transcription plus limité : le programme par défaut (latence I/II). Les cellules infectées se situent ensuite au niveau du compartiment des cellules B mémoires, où le virus peut persister tout au long de la vie de l'hôte en latence 0 à l'état quiescent ou en latence I lorsqu'elles se répliquent (Thorley-Lawson, 2015, revue). Les cellules B mémoires circulent entre le sang et les tissus lymphoïdes oropharyngés. La réactivation virale peut survenir lorsque ces cellules pénètrent

dans les tissus lymphoïdes de l'oropharynx, entraînant une réplication virale et une exsudation du virus (Küppers, 2003; Kutok and Wang, 2006; Rickinson et al., 2014; Thorley-Lawson et al., 2008). Ce cycle d'infection et l'état de repos dans les cellules B mémoires permettent une persistance durant toute la vie de l'hôte, de manière très stable (Thorley-Lawson, 2015).

La **Figure 12** schématise les étapes d'infection primaire et de réactivation virale.

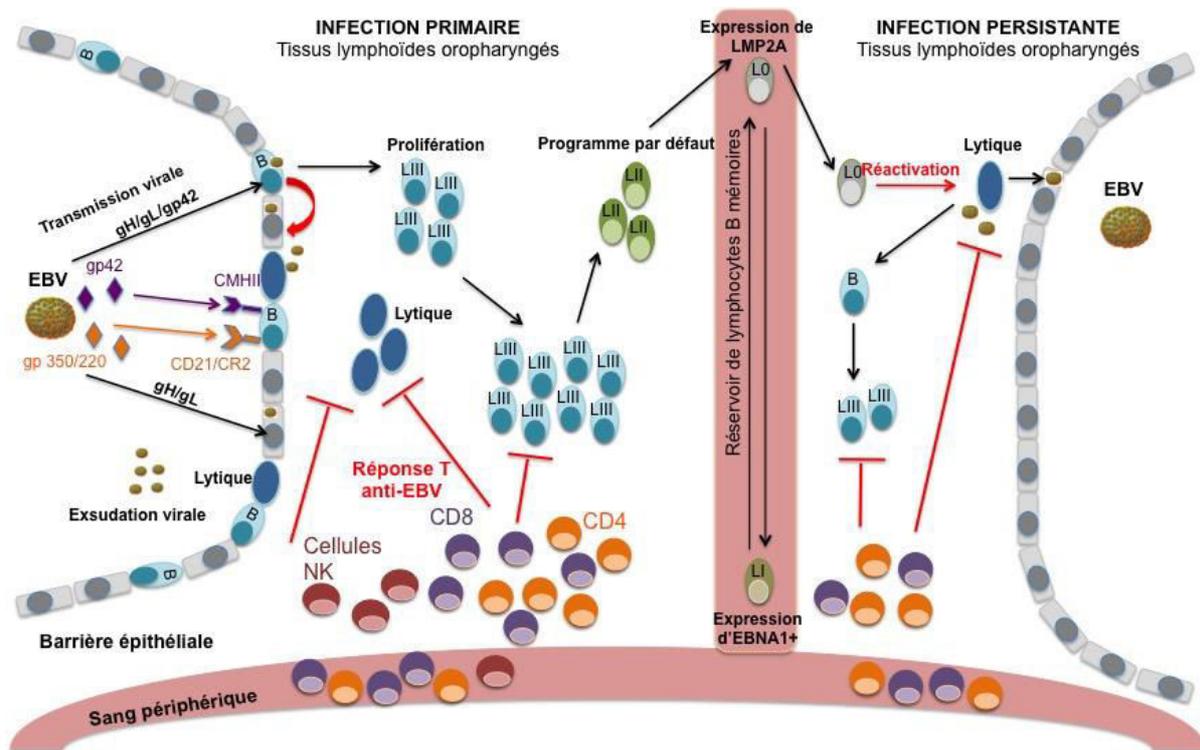


Figure 12 : Infection primaire et persistante par l'EBV *in vivo* chez des individus immunocompétents.

L'infection primaire par l'EBV est établie au niveau des tissus lymphoïdes oropharyngés. L'EBV infecte les lymphocytes B par la liaison entre la glycoprotéine gp42 du virus et le récepteur CD21/CR2 du lymphocyte B. La glycoprotéine gp42 se lie au CMH de classe II du lymphocyte B. La gp42 se lie au complexe gHgL *via* une forte interaction avec la gH. Le complexe trimérique contribue à l'entrée du virus dans les lymphocytes B. Les cellules épithéliales sont infectées via le complexe gHgL, et par un système de transfert du CD21 des lymphocytes B aux cellules épithéliales (flèches rouges). Ensuite, le virus passe à une forme de latence III, qui correspond à la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV. Ces cellules étant hautement immunogènes par l'expression de l'ensemble des protéines de latence exprimées, elles sont éliminées par les lymphocytes T anti-EBV, ainsi que par une activation des cellules NK chez les hôtes immunocompétents. Les lymphocytes B infectés régulent négativement l'expression de ces protéines immunogènes, permettant la pérennité virale (programme de latence II, ou programme par défaut). Ces cellules migrent ensuite vers le sang périphérique. La persistance virale est principalement obtenue par l'infection silencieuse des cellules B mémoires, où l'ADN viral est maintenu sous forme épisomale et où seulement EBNA1 est exprimée (programme de latence I), ou les transcrits de LMP2A (programme de latence 0). Certaines de ces cellules en latence 0 peuvent être réactivées et repasser en phase lytique. Cette réactivation peut conduire à la prolifération de cellules en programme de latence III, contrôlée par la réponse T anti-EBV CD4+ et CD8+. La production de nouvelles particules virales peut entraîner de nouveaux foyers infectieux qui peuvent conduire à la libération de virions au niveau de la gorge. La surveillance immunitaire continue pendant le cycle lytique et la latence est importante pour le contrôle viral. Inspiré d'après (Tangye et al., 2017; Tashiro and Brenner, 2017).

Le **Tableau 2** récapitule les différents états du cycle de l'EBV, le tropisme cellulaire propre à chaque phase ainsi que les principales pathologies associées.

Cycle de l'EBV	Programme de l'EBV	Tropisme cellulaire	Pathologies associées
Lytique	Cycle lytique	Cellules épithéliales, Cellules B naïves	Cancers lymphoïdes
Latence	III	Cellules B naïves	Lymphomes chez les sujets immunodéprimés (PTLD, VIH)
	II	Cellules B du centre germinatif, Cellules épithéliales	NPC, LH, Cancer des cellules T/NK
	I	Cellules B mémoires en cycle, Cellules épithéliales	LB, CG
	0	Cellules B mémoires	-
	Atypique	Cellules B	LB

Tableau 2 : Programme de l'EBV, tropisme cellulaire et pathologies associées.

CG : Carcinome Gastrique ; EBV : Virus d'Epstein-Barr ; LB : Lymphome de Burkitt ; LH : Lymphome de Hodgkin ; NPC : Carcinome Nasopharyngé ; PTLN : Trouble Lymphoprolifératif Post-Transplantation ; VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine.

VI. Caractéristiques des cellules en latence III de l'EBV

Le programme de latence III de l'EBV étant au centre de notre étude, nous nous intéresserons de manière plus conséquente à ce type de latence dans les paragraphes suivants.

Ces derniers feront l'objet des protéines virales exprimées lors de cette phase, de leurs caractéristiques phénotypiques, des cytokines sécrétées et des voies de signalisation détournées durant ce programme.

VI.1. Protéines et ARNs viraux de la latence III

VI.1.A. Protéines nucléaires

VI.1.A.1. EBNA1

La protéine EBNA1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen 1) est composée de 641 acides aminés. Elle comporte des régions riches en Glycine/arginine (Gly/Arg), Glycine/Alanine (Gly/Ala), un site de liaison à l'Ubiquitin Specific Processing Protease 7 (USP7), et un domaine de liaison à l'ADN (**Figure 13**).

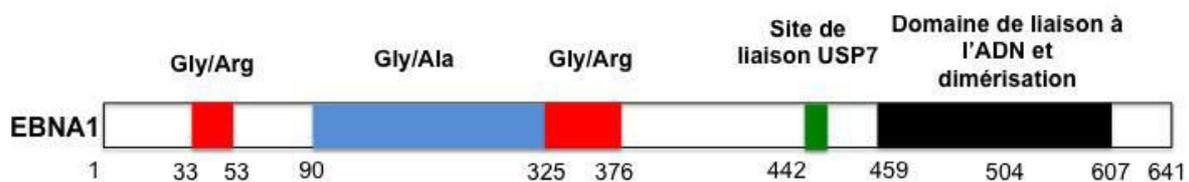


Figure 13 : Schéma représentant la structure de la protéine EBNA1.

Les régions en rouge correspondent à des séquences riches en Glycine et Arginine. La partie en bleu représente une région de répétitions de Glycine/Alanine. Le site de liaison à USP7 (Ubiquitin Specific Processing Protease 7) est indiqué en vert, et le domaine de liaison à l'ADN et de dimérisation en noir. Le numéro des acides aminés est indiqué en dessous. Modifié d'après (Frappier, 2012).

EBNA1 est exprimée dans toutes les formes de latences de l'EBV. La première fonction identifiée d'EBNA1 fut son implication dans la persistance du génome du virus sous sa forme latente, sous forme d'épisomes circulaires dans le noyau (Yates et al., 1985). Elle joue un rôle dans la réplication et la ségrégation mitotique des épisomes de l'EBV, en interagissant directement avec les séquences d'origine de réplication latente (Reisman et al., 1985). Cette protéine est impliquée dans l'efficacité du processus d'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Altmann et al., 2006; Humme et al., 2003).

Plusieurs études ont mis en évidence l'implication d'EBNA1 dans la diminution du processus d'apoptose et à l'augmentation de la survie cellulaire (Frappier 2012, revue).

Kennedy et ses collaborateurs ont montré que l'inhibition d'EBNA1 conduit à une diminution de la survie cellulaire, en augmentant l'apoptose des cellules issues de lymphomes de Burkitt associés à l'EBV (programme de latence I). Ces expériences suggèrent que cette protéine est essentielle pour la survie des cellules de lymphomes de Burkitt EBV-positives (Kennedy et al., 2003).

EBNA1 inhibe la voie de signalisation de TGF- β 1, en augmentant le renouvellement de la protéine SMAD2. Ce renouvellement conduit à la diminution des niveaux de SMAD2 sous forme de complexes, ces derniers étant nécessaires à l'initiation de transcription de TGF- β 1 (Wood et al., 2007). La voie de NF- κ B (Nuclear Factor – κ B) est également affectée par EBNA1. Selon Valentine et al., EBNA1 inhibe la voie canonique de NF- κ B dans des lignées cellulaires issues de carcinomes nasopharyngés, en inhibant la phosphorylation de IKK α/β (Valentine et al., 2010).

EBNA1 est également impliquée dans l'augmentation du stress oxydatif, conduisant à l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) (Gruhne et al., 2009; Kamranvar and Masucci, 2011). Elle est responsable de l'augmentation de la transcription du gène de la survivine. Cette protéine est un inhibiteur de l'apoptose cellulaire, elle est surexprimée dans les cellules infectées par l'EBV. La surexpression de la survivine contribue à la survie des lymphocytes B immortalisés par le virus (Lu et al., 2011).

EBNA1 est également dotée d'un mécanisme d'action en cis, qui permet aux cellules hôtes infectées par le virus d'échapper au système immunitaire. Cet échappement s'établit grâce à une répétition particulière de Glycine –Alanine (GAR : Glycin Alanin Repeat) dans EBNA1, qui a la capacité de supprimer la présentation de l'antigène au Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de type I. Avec ses propriétés de maintenance du génome viral et d'échappement au système immunitaire de l'hôte, EBNA1 apparaît être une cible privilégiée pour des thérapies spécifiques contre les cancers EBV-positifs (Daskalogianni et al., 2015).

V.1.A.2. EBNA2

La protéine EBNA2 est composée de 487 acides aminés. Elle comporte 9 régions conservées (CRs : Conserved Regions). Les CR1, 2 et 7 sont nécessaires pour l'activation de la protéine EBNA-Leader Protein (LP). Les CR5 et 6 sont impliquées dans la liaison à RBP-J κ (Protéine de Liaison de la Recombinaison de J κ). Le domaine de transactivation TAD (Transactivation Domain) et la séquence de localisation nucléaire (NLS : Nuclear Localization Sequence) sont localisés au niveau des CR8 et 9, respectivement (**Figure 14**).

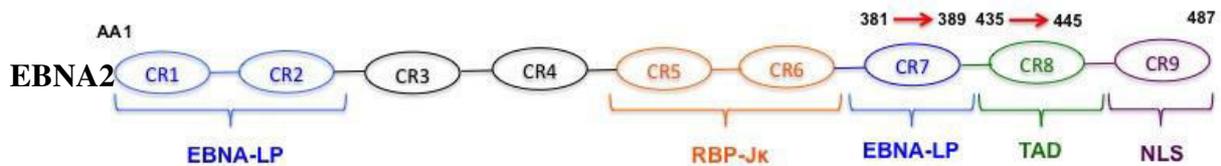


Figure 14 : Schéma représentant la structure de la protéine EBNA2.

CRs : Régions Conservées. Les CR1, CR2 et CR7 sont nécessaires pour l'activation de EBNA-LP. CR5 et CR6 permettent la liaison de RBP-Jκ (Protéine de Liaison de la Recombinaison de Jκ). Le Domaine de Transactivation (TAD) est localisé à la CR7, et la Séquence de Localisation Nucléaire (NLS) au niveau de CR9. Le numéro des acides aminés est indiqué au dessus des régions conservées. Inspiré d'après (Harter et al., 2016).

EBNA2 possède un domaine de transactivation, mais pas un domaine de liaison à l'ADN. Cette liaison est effectuée par le biais de la protéine de liaison RBP- Jκ, autrement appelée Facteur de Liaison au promoteur C de type 1(CBF-1).

Grossman et son équipe ont démontré que le transactivateur d'EBNA2 serait dirigé par des éléments de réponse par le signal de la protéine de liaison de la recombinaison de Jκ (Grossman et al., 1994). Selon Waltzer et al, RBP-Jκ interagirait directement avec EBNA2 en solution et recruterait EBNA2 et ses séquences d'ADN apparentées. Ces données suggèrent que RBP-Jκ pourrait médier la transactivation d'EBNA2 au niveau des gènes cellulaires et viraux (Waltzer et al., 1994). Une autre étude menée par Waltzer et al suggère que EBNA2 active la transcription en interférant avec la fonction d'un co-répresseur recruté par RBP-Jκ, et par l'intermédiaire de son domaine d'activation (Waltzer et al., 1995).

Hsieh et al ont identifié que Notch1 possède des homologies fonctionnelles avec EBNA2, en activant RBP-Jκ/CBF-1 pour réprimer les gènes cibles. D'après les auteurs, le mimétisme de la transduction du signal de Notch est impliqué dans l'immortalisation des cellules B par l'EBV (Hsieh et al., 1996).

EBNA2 est une protéine exprimée uniquement en programme de latence III de l'EBV. Elle est essentielle pour l'établissement de lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs). Cette fonction a été identifiée pour la première fois grâce à la lignée P3HR1, un sous-clone provenant de la lignée cellulaire issue d'un lymphome de Burkitt Jijoye, produisant un virus incapable d'immortaliser les lymphocytes B *in vitro* (Miller et al., 1974). P3HR1 comporte une délétion de 6,8 kpb qui excise entièrement l'ORF d'EBNA2 du génome viral (Bornkamm et al., 1982b; Rabson et al., 1982).

Les acides aminés 3 à 30 d'EBNA2 sont nécessaires à l'expression de la protéine membranaire LMP1 dans les LCLs. Ces acides aminés sont nécessaires pour stimuler

l'expression des gènes viraux et cellulaires nécessaires à l'immortalisation des cellules B *in vitro* (Gordadze et al. 2004).

Il existe deux types sérologiques du virus d'Epstein-Barr : le type 1 et le type 2, correspondant à EBNA2A et 2B, respectivement. Le type 1 immortalise avec une meilleure efficacité les lymphocytes B *in vitro*, comparativement au type 2. Cette meilleure capacité de transformation est attribuable aux différences présentes au sein du gène EBNA2 (Cohen et al., 1989). L'analyse transcriptomique des gènes cibles d'EBNA2 a permis d'identifier quelques gènes plus fortement induits dans le type 1 comparé au type 2. L'un de ces gènes, *CXCR7* (C-X-C Récepteur à la Chémokine de type 7), également connu sous le nom de *ACKR3* (Récepteur Atypique de la Chémokine de type 3) est nécessaire pour la prolifération des LCLs (Lucchesi et al., 2008).

Récemment, Kim et son équipe ont montré que l'expression d'EBNA2 est corrélée à une surexpression des chémokines CCL3 (Chémokine Ligand 3) et CCL4 (Chémokine Ligand 4) dans les cellules issues de lymphomes (Kim et al., 2016). La surexpression de ces chémokines conduit à une activation des voies Btk (tyrosine kinase Bruton) et NF- κ B. L'activation de ces voies de signalisation favorise la résistance des cellules cancéreuses à la doxorubicine, utilisée pour traiter les lymphomes B. Cette étude apporte des perspectives thérapeutiques, notamment en ciblant les voies Btk et NF- κ B dans le cadre de lymphomes B diffus à grandes cellules (DLBCL), ou en évaluant les niveaux de CCL3 et CCL4 afin de détecter les patients atteints par ce type de lymphome (Kim et al., 2016).

VI.1.A.3. Les EBNA3

Les EBNA3 sont des protéines exprimées uniquement lors du programme de latence III de l'EBV. Il existe trois variants d'EBNA3 : EBNA3A, 3B et 3C (historiquement nommées EBNA3, EBNA4 et EBNA6, respectivement). La structure des trois variants est présentée *Figure 15*.

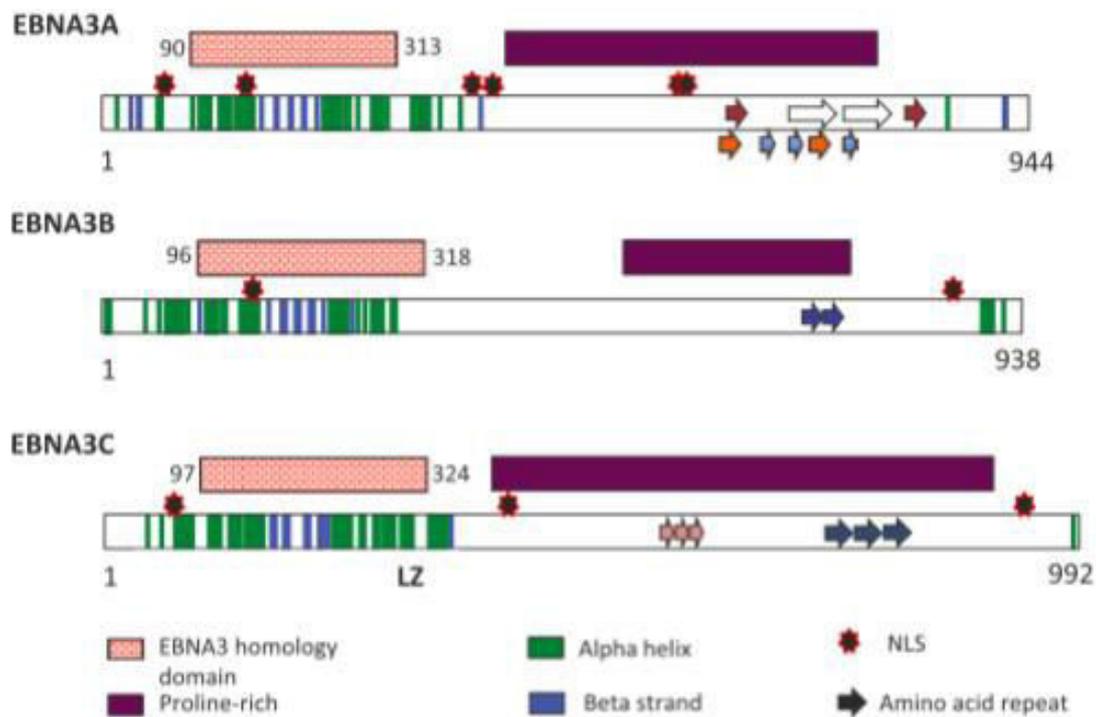


Figure 15 : Schéma représentant la structure des protéines EBNA3A, -3B, -3C.

Les domaines et motifs structuraux sont représentés par des rectangles verts et bleus, comme indiqué. Les séquences de localisation nucléaire (NLS) sont symbolisées par des étoiles. Les flèches colorées similaires représentent des répétitions des mêmes acides aminés. Les régions riches en proline sont représentées par les rectangles pourpres. LZ : Leucine Zipper. D'après (Allday et al., 2015).

Les gènes codant pour les trois protéines se situent au niveau d'un arrangement en tandem dans une région de 10kpb, entre les coordonnées 92 000 et 102 000 pb (Baer et al., 1984). Le cadre de lecture ouvert pour chaque protéine est généré par élimination d'un intron de petite taille qui sépare une séquence N-terminale courte d'un long cadre de lecture en C-terminal.

Tous les EBNA3 se lient à la même région de RBP-Jκ. Ils ont également tous la capacité d'inhiber la transactivation du promoteur du gène de la protéine virale terminale de type 1 (TP-1), médiée par EBNA2 (Le Roux et al., 1994). Les protéines EBNA3 sont essentielles pour la persistance de l'EBV dans les lymphocytes B, et peuvent induire la lymphomagenèse au sein de ces cellules (Allday et al., 2015, revue). Tomkinson et son équipe ont identifié que EBNA3A et 3C sont essentielles pour le processus de transformation des lymphocytes B en lignées cellulaires lymphoblastoïdes *in vitro* (Tomkinson et al., 1993). Ces deux variants sont les principaux acteurs de la résistance aux médicaments cytotoxiques, et agissent comme des régulateurs négatifs du médiateur pro-apoptotique Bim (autrement appelé BCL2L11 : Bcl-2-like Protein 11), membre de la famille des Bcl-2. Ce processus accentue l'efficacité de l'immortalisation des lymphocytes B en culture (Anderton et al., 2008). Plus

récemment, Ohashi et *al* ont montré que le domaine WDR48 (Répétition WD contenant la protéine 48) associé aux domaines d'EBNA3A et 3C sont essentiels pour la prolifération des LCLs, suggérant l'importance du complexe USP46/USP12 (Peptidase Spécifique de l'Ubiquitine) dans la transformation des lymphocytes B *in vitro* (Ohashi et al., 2015). Des expériences de séquençage d'immunoprécipitation de la chromatine (Chip-Seq) sur des LCLs ont permis d'identifier que la sous-unité β du facteur de liaison au noyau (CBF β), qui se dimérise avec RUNX3 (Facteur de Transcription de Runt de type 3), peut fortement co-immunoprécipiter avec EBNA3B et EBNA3C, et faiblement avec EBNA3A (Paschos et al., 2016). Yi et *al* ont découvert que EBNA3C peut cibler p53 afin de réprimer son activité transcriptionnelle (Yi et al., 2009).

Selon Burrows et son équipe, les EBNA3 seraient nécessaires à la génération de cellules T anti-EBV spécifiques (Burrows et al., 1994). Les protéines EBNA coopèrent entre elles afin de moduler l'expression des gènes de l'hôte. Elles sont impliquées dans la régulation de l'apoptose, de la migration cellulaire, et de la différenciation des lymphocytes B. Elles sont également capables d'induire des modifications épigénétiques. Ces études révèlent la complexité de l'interaction entre l'EBV et l'hôte, où les protéines EBNA peuvent s'associer pour moduler l'environnement et le comportement de la cellule hôte (White et al., 2010).

VI.1.A.4. EBNA-LP

EBNA-LP (Leader Protein), ou EBNA-5 a été la 5^{ème} protéine virale à être identifiée comme essentielle à la croissance des cellules B transformées (Dillner et al., 1986). Cette protéine est transcrite à partir du promoteur Wp. Le cadre de lecture ouvert d'EBNA-LP dérive des répétitions des exons W1 et W2 de l'unité de répétition interne principale (IR1), et les exons Y1 et Y2 en aval de IR1 (*Figure 16*).

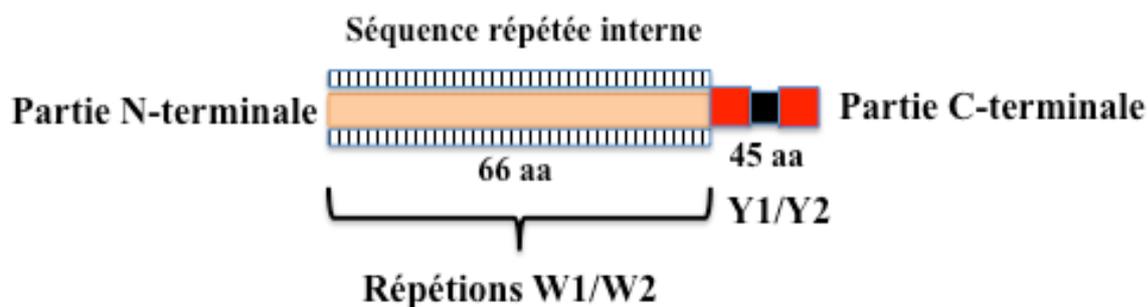


Figure 16 : Structure de la région codante de la protéine EBNA-LP.

La partie N-terminale de la protéine est composée de tandems en répétition codés par les exons W1 et W2, comportant 66 acides aminés. La partie C-terminale est composée par les deux exons Y1 et Y2, elle est constituée de 45 acides aminés.

Mannick et ses collaborateurs ont découvert que les exons Y1 et Y2 sont essentiels au processus d'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* (Mannick et al., 1991). EBNA-LP joue le rôle de coactivateur d'EBNA2, en stimulant l'activation d'EBNA2 au niveau du promoteur de LMP1 et du promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2B (Harada and Kieff, 1997). Les fonctions régulatrices d'EBNA-LP se situent au niveau des exons W1 et W2. Au moins deux copies de répétitions W1/W2 sont nécessaires à la fonction de co-activation de EBNA-LP. Selon Yokoyama et al., le résidu sérine à la position 35 de l'exon W2 est le site majeur de phosphorylation d'EBNA-LP *in vivo*, lui conférant une fonction indispensable pour la coactivation d'EBNA2 et l'induction de l'expression de LMP1 (Yokoyama et al., 2001). EBNA-LP est majoritairement localisée au niveau nucléaire. Cependant, elle peut également être retrouvée dans le cytoplasme (Garibal et al., 2007). Elle a pour fonction d'éliminer le complexe répresseur NCor/HA95 à partir de sites promoteurs et de les transférer du noyau vers le cytoplasme (Han et al., 2001). Ling et ses collaborateurs ont identifié que la protéine Sp100 est essentielle à la fonction co-activatrice d'EBNA-LP, qui stimule l'activation de la protéine EBNA2 (Ling et al., 2005). EBNA-LP est nécessaire pour l'activation de EBNA2, la protéine gouvernant le programme de latence III de l'EBV.

VI.B. Protéines membranaires

VI.1.B.1. LMP1

LMP1 (Latent Membran Protein 1) est l'oncoprotéine majeure de l'EBV. Il s'agit d'une protéine membranaire jouant de multiples rôles. Elle comprend trois domaines : une courte partie cytoplasmique N-terminale, six régions transmembranaires, et une longue queue localisée en C-terminal au niveau cytoplasmique (**Figure 17**).

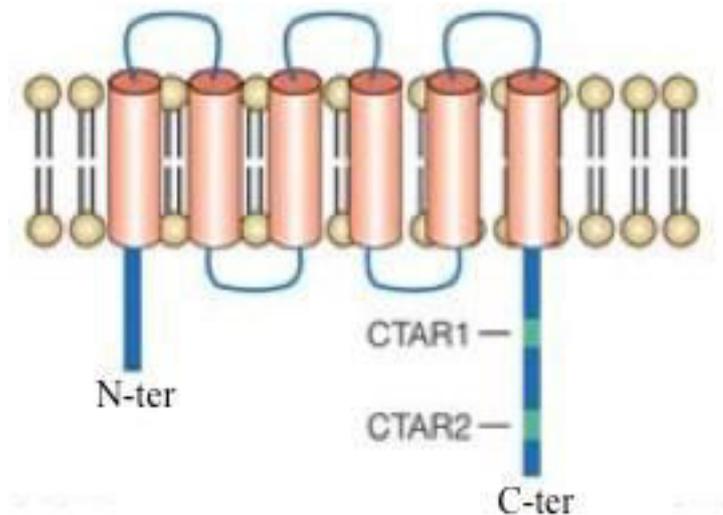


Figure 17: Structure de la protéine LMP1.

La partie N-terminale de la protéine est composée de 24 acides aminés. La partie C-terminale est une longue queue composée de 200 acides aminés. La région CTAR1 permet la fixation des protéines TRAFs, la région CTAR2 est essentielle pour la fixation des TRADDs. Entre les deux extrémités, se trouvent six régions transmembranaires. Modifié d'après (Khanna et al., 2005).

L'expression de LMP1 dans les cancers associés à l'EBV est corrélée à la régulation de la prolifération et de l'immortalisation des cellules tumorales. LMP1 joue également un rôle dans l'invasion et l'angiogenèse des cellules tumorales (Young and Rickinson, 2004; Dawson et al., 2012; Macsween and Crawford, 2003; Young and Murray, 2003, revues). Cette protéine membranaire joue un rôle d'activateur de la voie de signalisation NF- κ B. La forte expression de LMP1, impliquant l'activation NF- κ B, est corrélée au nombre de copies du génome latent de l'EBV, augmentant ainsi ses capacités oncogéniques (Faumont et al., 2009; Zuo et al., 2015).

LMP1 active la voie de signalisation du récepteur du facteur de nécrose tumorale (TNFR), en recrutant les facteurs associés aux TNFR (TRAF) et d'autres protéines adaptatives (Kaye et al., 1996). Arcipowski et Bishop ont montré que les protéines TRAF3, 5, et 6 sont nécessaires pour les fonctions de LMP1 (Arcipowski and Bishop, 2012). L'expression de TRAF1 conduit à l'activation exacerbée des voies P38, JNK, Erk et à celle de la voie canonique de NF- κ B par la région activatrice de la partie C-terminale (CTAR1) de LMP1 (Greenfeld et al., 2015). LMP1 possède des homologies fonctionnelles avec CD40, ce qui favorise la prolifération des lymphocytes B immortalisés (Lam and Sugden, 2003).

L'activation de la voie P38 par LMP1 conduit à l'induction du facteur de transcription ATF2, également impliqué dans la surexpression des interleukines 6 et 8 (Eliopoulos et al., 1999b). Cette protéine induit l'expression de l'interleukine 10 dans les cellules issues de lymphomes de Burkitt, par la voie p38/SAPK2 (Protéine Kinase Activée par le Stress) (Vockerodt et al., 2001). L'expression de LMP1 conduit à l'activation des JNK (C-Jun N-terminal Kinases), par l'intermédiaire des protéines TRAF2 et TRADD (Eliopoulos et al., 1999a). LMP1 déclenche également l'expression du facteur de transcription AP-1 par la cascade des JNK (Kieser et al., 1997). Morris et al ont montré que LMP1 agit comme une molécule modulatrice de l'adhésion cellulaire *via* la régulation de l'activation de la signalisation de l'intégrine A et de TGF- β (Morris et al., 2016).

LMP1 peut également être localisée dans des petites vésicules extracellulaires : les exosomes. Le trafic de LMP1 au sein de ces vésicules altère le contenu et les fonctions des exosomes. Les exosomes modifiés par LMP1 améliorent la croissance, la migration, et le pouvoir invasif des cellules malignes. Le trafic de LMP1 par le biais des exosomes démontre la capacité du virus à manipuler le microenvironnement tumoral et d'améliorer la progression des tumeurs liées à l'EBV (Hurwitz et al., 2017).

Bi et al ont montré que l'immuno-inhibiteur Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) est surexprimé par les cellules EBV-positives, comparé aux cellules non infectées par l'EBV. Les auteurs ont démontré que cette surexpression est corrélée à l'expression de LMP1, et que les protéines de la voie MAPK/NF- κ B sont exprimées par les cellules exprimant PD-L1. La surexpression de PD-L1 est corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients atteints de lymphomes T/NK (Bi et al., 2016a).

L'expression de LMP1 est également corrélée à un mauvais pronostic de survie des patients atteints de lymphomes non-Hogkiniens. Toutefois, ce pronostic vital médiocre n'a pas été montré chez les patients atteints de maladie de Hodgkin (Mao et al., 2013). Plusieurs études tentent de cibler cette oncoprotéine majeure pour limiter l'apparition de pathologies liées à l'EBV (Gottschalk et al., 2003; Delbende et al., 2009). Une étude préclinique prometteuse effectuée sur un modèle murin révèle qu'un vaccin thérapeutique ciblant LMP1 supprime la croissance tumorale et les métastases *in vivo* (Lin et al., 2017).

VI.1.B.2. LMP2A

LMP2A est une protéine composée de 12 domaines transmembranaires comprenant une queue C-terminale cytoplasmique de 27 acides aminés, ainsi qu'un domaine amino-terminal cytoplasmique composé de 119 acides aminés. Cette protéine est composée d'une variété de motifs hautement conservés, avec des fonctionnalités importantes. Le domaine N-terminal de LMP2A contient des motifs sérine, tyrosine et proline, tandis que les domaines transmembranaires et C-terminal sont riches en motifs cystéine. Fruehling et *al* ont montré que trois motifs riches en tyrosine de la partie N-terminale jouent un rôle important dans le blocage de la signalisation du BCR après phosphorylation (Fruehling et al., 1996). Les résidus tyrosine localisés aux positions 74 et 85 possèdent des séquences conservées de tyrosine et de leucine appariées (YXXL), qui constituent le motif Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM). Ce motif est impliqué dans le blocage de transduction du signal BCR (Fruehling and Longnecker, 1997). Selon Fukuda et Kawaguchi, l'interaction entre le motif ITAM et la protéine Syk est un élément clé dans la transformation des lymphocytes B, médiée par LMP2A (Fukuda and Kawaguchi, 2014). LMP2A possède des homologies fonctionnelles avec le BCR et promeut la survie des lymphocytes B infectés par l'EBV (Mancao and Hammerschmidt, 2007). Cette protéine est impliquée dans la surexpression de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, *via* la voie PI3K/AKT (Incrocci et al., 2013). LMP2A est à l'origine de la surexpression des gènes associés à l'induction du cycle cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. Elle conduit également à la sous-expression des gènes associés aux facteurs spécifiques des lymphocytes B et à l'immunité, tout comme les cellules de Reed-Sternberg issues de lymphome de Hodgkin (HRS) (Portis et al., 2003). L'inhibition de l'expression de LMP2A par un système lentiviral permet la diminution de la prolifération de cellules issues de carcinome gastrique *in vitro*, suggérant que LMP2A est une cible thérapeutique potentielle pour le traitement contre ce type de cancers (Wang et al., 2017). La **Figure 18** schématise les modifications cellulaires induites par LMP2A.

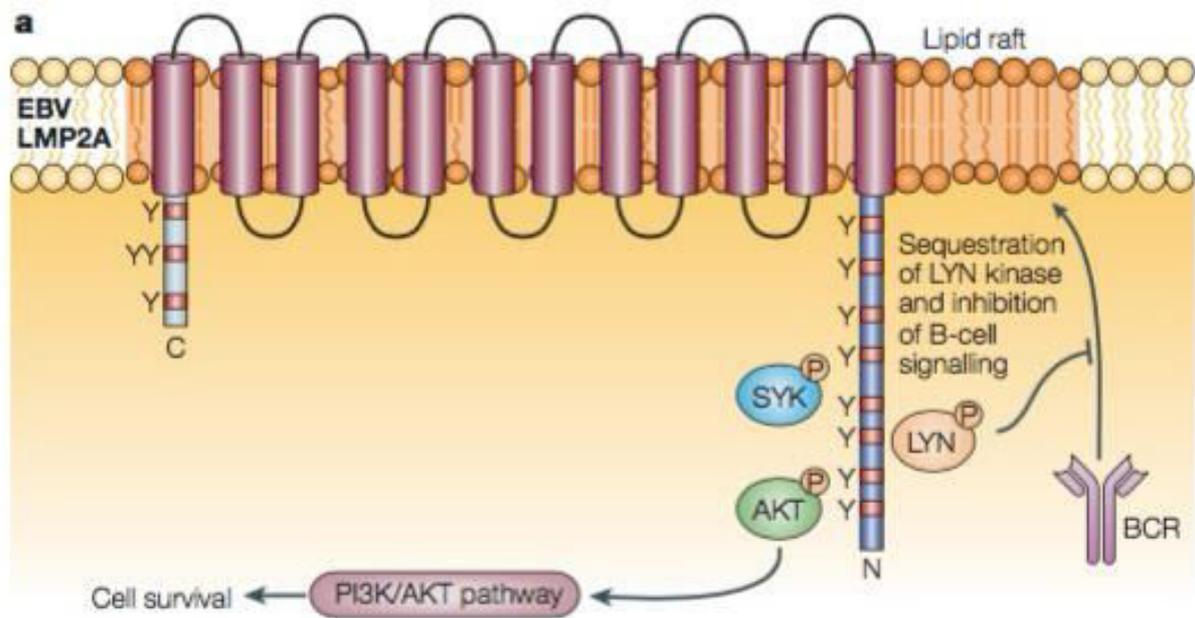


Figure 18 : Modifications cellulaires induites par l'expression de LMP2A.

LMP2A comporte de nombreux résidus Tyrosine (Y) pouvant interagir avec les protéines SYK et LYN. Une des interactions conduit à la séquestration de la protéine kinase LYN du complexe BCR, aboutissant à l'inhibition des voies de signalisation des lymphocytes B. La phosphorylation de AKT conduit à l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT, impliquée dans la survie cellulaire. D'après (Damania, 2004).

VI.1.B.3. LMP2B

Les travaux de Rechsteiner et *al* ont montré que la surexpression de LMP2B conduit à une commutation de l'EBV de la forme latente à la forme lytique. Cette commutation n'est pas observée dans les cellules sur-exprimant LMP2A. LMP2B diminue le degré de réticulation du BCR, requis pour induire le cycle lytique de l'EBV. Des expériences d'immunoprécipitation et d'immunofluorescence ont révélé que les deux formes de LMP2 sont co-localisées. Les auteurs ont identifié que LMP2B régule négativement LMP2A, afin de prévenir le passage de la réplication latente à la phase lytique de l'EBV (Rechsteiner et al., 2008). La restauration de la transduction du signal BCR normal survient lorsque LMP2A et LMP2B sont conjointement exprimées. Cela conduit à une restauration du niveau d'expression de la protéine Lyn. Ces résultats confirment que LMP2B module l'activité de LMP2A, en rétablissant la transduction du signal BCR (Rovedo and Longnecker, 2007).

VI.1.C. ARNs viraux de latence

VI.1.C.1. Les EBERs

Les EBERs (EBV-encoded RNAs) sont des ARNs non codants présents dans tous les états de latence. Il en existe deux types : EBER-1 et -2. Ils ne sont pas décrits comme essentiels lors du processus transformant des lymphocytes B primaires par l'EBV. Les EBERs se rassemblent en particules de ribonucléoprotéines stables avec l'auto-antigène La (Lerner et al., 1981).

Selon Toczyski et al, EBER-1 peut se lier avec la protéine ribosomale L22 dans les lymphocytes B infectés par l'EBV (Toczyski et al., 1994). Les EBERs se lient également à la protéine kinase activée par l'ARN (PKR) induite par l'interféron-alpha (IFN- α) (Clemens et al., 1994). La PKR joue un rôle dans la médiation des effets antiviraux des interférons. L'équipe de Nanbo a démontré que l'inhibition des fonctions de la PKR par les EBERs peut contribuer à la persistance virale, en protégeant les cellules contre l'apoptose, *via* l'IFN- α (Nanbo et al., 2002).

Des études ont révélé que EBER-1 est capable d'augmenter la synthèse protéique, par un mécanisme indépendant du PKR dans des cellules NIH 3T3 transfectées (Laing et al., 2002). L'expression de l'IL-10 est retrouvée dans les tumeurs de lymphomes de Burkitt EBV-positives, contrairement aux tumeurs EBV-négatives. Il a également été observé que les EBERs peuvent induire l'expression de l'IL-10 dans des lignées de lymphomes de Burkitt. Ces données suggèrent que l'IL-10 est une cytokine importante dans l'induction des lymphomes de Burkitt EBV-positifs (Kitagawa et al., 2000) . Iwakiri et al ont montré que les EBERs induisent l'expression de l'IL-10, en activant la voie du facteur 3 de régulation RIG-I /Interféron, suggérant que la modulation de la signalisation immunitaire innée médiée par les EBERs contribue à l'oncogénèse EBV-dépendante (Iwakiri, 2014).

VI.1.C.2. Les BARTs et les micro-ARNs

Les BARTs (BamHI-A Rightward Transcripts) sont des ARNs qui représentent un groupe d'ARNs épissés de manière hétérogène, d'une taille de 4 à 8 kpb (Sadler and Raab-Traub, 1995; Smith et al., 2000). Cet épissage alternatif complexe conduit à la production de plusieurs cadres de lecture ouverts et constituent des précurseurs pour les micro-ARNs (mi-ARNs).

Les BARTs ont été découverts pour la première fois dans des tissus issus d'un carcinome nasopharyngé (Hitt et al., 1989). Ils ont ensuite été identifiés dans d'autres pathologies associées à l'EBV, telles que la maladie de Hodgkin (Deacon et al., 1993), le lymphome T/NK extraganglionnaire de type nasal (Chiang et al., 1996), le lymphome de Burkitt (Tao et al., 1998), mais également au niveau des lymphocytes B du sang périphérique chez des individus sains (Chen et al., 1999).

Robertson et al ont montré qu'un virus recombinant dont la partie du génome codant pour la région des BARTs a été délétée parvient à immortaliser les lymphocytes *B in vitro* (Robertson et al., 1994). Ces résultats suggèrent que les transcrits des BARTs ne sont pas nécessaires à la transformation des cellules B. Toutefois, une expression abondante des transcrits BARTs est retrouvée dans des tumeurs liées à l'EBV qui n'expriment pas les protéines EBNA. Ces données suggèrent que les BARTs sont des facteurs importants dans le développement ou la croissance tumorale (Marquitz and Raab-Traub, 2012). L'expression la plus élevée des BARTs est retrouvée dans les cellules épithéliales infectées, y compris les cancers nasopharyngés et le cancer gastrique. Les BARTs possèderaient des propriétés spécifiques dans les cellules épithéliales (Marquitz and Raab-Traub, 2012).

Selon Verhoeven et al, NF- κ B active les promoteurs de BART et module leur expression dans des cellules issues de carcinome nasopharyngé infectées par l'EBV (Verhoeven et al., 2016).

L'épissage alternatif des BARTs conduit à l'apparition de micro-ARNs (miARNs). Les miARNs sont des petites molécules d'ARN non codantes (\approx 22 nucléotides) qui peuvent réguler négativement l'expression des gènes (Friedman et al., 2009). La dérégulation des miARNs a un impact sur tous les processus liés au cancer, tels que la prolifération, la mort cellulaire, la migration et le cycle cellulaire, parmi d'autres. De telles dérégulations fournissent des signatures de miARNs distinctes, qui permettent de discriminer les cellules normales des cellules tumorales de différents types cancéreux (Bofill-De Ros et al., 2017, revue).

Les cellules transformées par l'EBV expriment au moins 49 micro-ARNs viraux matures. Les fonctions de la plupart d'entre eux ne sont pas encore élucidées à ce jour (Sakamoto et al., 2017).

L'EBV code pour environ 30 micro-ARNs dans la région des BARTs. Grâce à des xéno greffes effectuées sur un modèle murin de carcinogénèse, Qiu et son équipe ont montré que les miARNs BARTs potentialisent la croissance et le développement des carcinomes *in vivo*. La croissance des tumeurs *in vivo* n'est pas associée avec l'expression de miARNs BARTs spécifiques, mais avec la surexpression de tous les micro-ARNs de la région des BARTs. Il en résulte que l'expression dérégulée des miARNs BARTs potentialise la croissance de la tumeur, et représente un mécanisme général d'oncogénèse liée à l'EBV (Qiu et al., 2015).

Récemment, il a été décrit que les micro-ARNs viraux et cellulaires, EBV-BART-6-3p et miR-197, peuvent compromettre les réponses immunitaires de l'individu hôte en diminuant les niveaux du récepteur de l'interleukine 6 (IL-6R) dans des lymphomes de Burkitt liés à l'EBV. Zhang et al ont montré que les deux micro-ARNs agissent en synergie contre l'IL-6R. Ces résultats permettent une meilleure compréhension du rôle de ces miARNs et de leur cible dans le développement de lymphomes de Burkitt EBV-positifs. Ils peuvent constituer des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de ces tumeurs (Zhang et al., 2017b).

Tagawa et ses collaborateurs ont montré que les micro-ARNs de l'EBV peuvent inhiber la libération de la cytokine pro-inflammatoire IL-12 des cellules B infectées (Tagawa et al., 2016). Ils peuvent également réprimer la différenciation des lymphocytes CD4+ naïfs en cellules Th1, et interférer avec la présentation du peptide sur le CMHII. Par ces mécanismes, ils diminuent l'activation des lymphocytes T effecteurs CD4+, les empêchant de contrôler la prolifération des lymphocytes B infectés par l'EBV (Tagawa et al., 2016).

Albanese et al se sont intéressés à l'impact des micro-ARNs de l'EBV sur la population lymphocytaire T CD8+. Ils ont constaté que les miARNs de l'EBV inhibent fortement la reconnaissance et la mort des lymphocytes B infectés par le virus par les lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'EBV, via de multiples mécanismes (Albanese et al., 2016). Les micro-ARNs de l'EBV ciblent la sous-unité de transporteur peptidique TAP2, et induisent une réduction de l'expression de TAP1, du CMHI et d'EBNA1. EBNA1 est exprimée dans la plupart des formes de latences de l'EBV et constitue une cible des lymphocytes T8 anti-EBV. De plus, la régulation négative de l'IL-12 via les micro-ARNs diminue la reconnaissance des cellules infectées par les lymphocytes T CD8+. Les auteurs révèlent un des mécanismes de l'EBV pour échapper aux mécanismes de surveillance de l'hôte, en inhibant les réponses CD4+ et CD8+ spécifiques du virus par le biais des miARNs (Albanese et al., 2016).

Sakamoto et ses collaborateurs ont étudié l'expression des différents miARNs en fonction des types tumoraux étudiés liés à l'EBV, par séquençage haut débit. Les résultats suggèrent que les

clusters de micro-ARNs codés par l'EBV sont associés au type de cancer, et au statut de l'infection virale au sein de ces tumeurs. Ces données cliniques pourraient être très utiles pour cibler thérapeutiquement spécifiquement les clusters de miARNs associés à chaque maladie liée au virus (Sakamoto et al., 2017).

VI.2. Caractéristiques phénotypiques des cellules B en latence III de l'EBV

Le phénotype des cellules en programme de latence III présente une certaine hétérogénéité. Wroblewski et ses collaborateurs ont montré que 70% des LCLs sur-expriment les marqueurs CD19 et CD20 (Wroblewski et al., 2002). Toutes ces cellules sont caractérisées par une forte expression du HLA-DR (Human Leucocyte Antigen - D-Related)/CMH de type II, alors que l'expression du CD40 est variable. Environ 65% d'entre elles sont CD23-positives et sécrètent des immunoglobulines, et plus de 90% des LCLs expriment les chaînes kappa et/ou lambda. L'ensemble des LCLs de cette étude ne possèdent pas les marqueurs des lymphocytes T (CD3), des cellules NK (CD16, CD56), des monocytes (CD14) ni des granulocytes (CD66b) (Wroblewski et al., 2002).

Le Clorennec et *al* ont montré que LMP1 régule positivement l'expression du facteur pro-apoptotique CD95/Fas à la surface des cellules B en latence III. La surexpression de ce facteur pro-apoptotique les sensibilise à l'apoptose *via* l'axe Fas/FasL (Le Clorennec et al., 2006).

Une autre étude menée par Durand-Panteix et ses collaborateurs révèle que les cellules B immortalisées en latence III surexpriment l'immuno-inhibiteur B7-H1 (PD-L1/CD274), ce qui protège les lymphocytes B de la mort par anergie des lymphocytes T dirigés contre l'EBV (Durand-Panteix et al., 2012).

VI.3. Cytokines sécrétées par les cellules B en latence III de l'EBV

Selon Wroblewski et *al*, les LCLs sécrètent des niveaux élevés d'IL-10, une cytokine ayant la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T. Elles produisent également l'IL-6, la sous-unité p40 de l'IL-12 et le TNF- α (Wroblewski et al., 2002). L'IL-10 peut être d'origine virale ou cellulaire. Le gène *BCRF1* de l'EBV code pour un homologue viral de l'IL-10 (hIL-10) : vIL-10 (IL-10 viral) (Rode et al., 1994). Il est transcrit durant la phase précoce du cycle lytique du virus et est essentiel à l'immortalisation des lymphocytes B. Il

joue également de multiples rôles dans l'évasion immunitaire de l'EBV, en inhibant la capacité des monocytes et des macrophages à induire l'activation des lymphocytes T (Miyazaki et al., 1993).

Dans le but de diagnostiquer de manière moins invasive les lymphomes B liés à l'EBV, Miyauchi et ses collaborateurs ont étudié la sécrétion d'un panel de 42 cytokines sur des cellules issues de lymphomes de Burkitt, de Lymphomes B Diffus à Grandes Cellules (DLBCLs), ou de LCLs. Cette étude révèle que les cellules issues de lymphomes de Burkitt EBV-positives sécrètent l'interleukine-10 (IL-10), l'IP10 (10 kDa Interféron gamma-induced Protein)/CXCL10 (C-X-C motif Ligand Chemokine 10), une chémokine aux motifs CC/CCL22 (Ligand de Chémokine 22), les protéines inflammatoires des macrophages (MIP)-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4. Les cellules en latence III et les cellules issues de DLBCLs associées à l'EBV produisent l'IL-8/CXCL8, l'IL-13, et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)-AA (Miyauchi et al., 2011).

Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33 sont également sécrétées par les LCLs (Ansari et al., 2013).

VI.3.A. Voies de signalisation détournées par la latence III de l'EBV

VI.3.A.1. NF- κ B

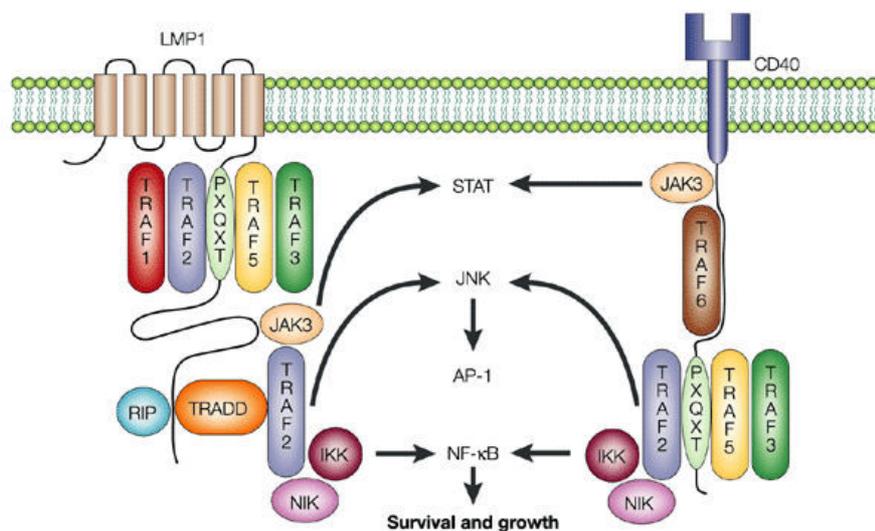
L'activité des dimères de NF- κ B peut être régulée par deux voies de signalisation différentes : une voie canonique (classique), ou non canonique (alternative). La voie classique est associée aux dimères composés des sous-unités RelA (p65), c-Rel et/ou p50. Les récepteurs associés à cette voie de NF- κ B sont notamment le récepteur des cellules B (BCR) ou les récepteurs de type Toll-like (TLRs). La voie alternative peut être activée par CD40 ou le récepteur de la lymphotoxine b (LTb), elle concerne les dimères associant RelB à p52 ou p50 (Karin, 1999).

Laherty et ses collaborateurs ont montré que la protéine LMP1 induit l'expression de la protéine A20/TNFAIP3 (TNF Alpha Induced Protein 3) en activant la voie de signalisation de NF- κ B (Laherty et al., 1992). Quelques années plus tard, Herrero et al ont identifié que LMP1 active NF- κ B en ciblant la molécule inhibitrice de NF- κ B, I κ B α (Herrero et al., 1995). Devergne et son équipe ont identifié que l'association constitutive des TRAFs avec LMP1 est essentielle pour l'activation de NF- κ B et l'immortalisation des lymphocytes B (Devergne et

al., 1996). Depuis, de nombreuses études ont évalué le rôle de NF- κ B dans l'infection virale, ainsi que son implication dans le développement de tumeurs associées à l'EBV (de Oliveira et al., 2010, revue).

Faumont et al ont mené une étude sur des lignées issues de lymphomes de Burkitt, des LCLs et une lignée inductible pour l'expression de c-Myc. D'après les auteurs, NF- κ B et c-Myc sont les deux facteurs de transcription majeurs détournés par le programme de latence III de l'EBV. Ces deux facteurs sont en partie impliqués dans le phénotype, le profil de croissance et les propriétés biologiques des lymphocytes B immortalisés par le virus d'Epstein-Barr (Faumont et al., 2009).

Dans un modèle de souris transgéniques, Uchida et ses collaborateurs ont montré que l'oncoprotéine LMP1 mime la signalisation de CD40 pour induire la différenciation cellulaire B. Ces propriétés spécifiques de LMP1 peuvent déterminer le site de l'infection primaire des lymphocytes B naïfs, et l'état de l'infection par l'EBV (Uchida et al., 1999), confirmant les résultats obtenus par Gires et son équipe (Gires et al., 1997) (**Figure 19**).



Nature Reviews | Immunology

Figure 19 : Mimétisme de CD40 par LMP1 et activation de la voie NF- κ B.

Les protéines LMP1 et CD40 possèdent toutes les deux des domaines de liaison avec les facteurs TRAF et interagissent avec de multiples membres de cette famille. LMP1 et CD40 interagissent avec la kinase JAK3 et les protéines STAT. Elles activent le complexe de transcription de la protéine AP-1 par la voie de signalisation JNK. La libération de protéine kinase IKK, composée de plusieurs sous-unités et qui constitue une des protéines inhibitrice de NF- κ B, déclenche la transcription de gènes anti-apoptotiques dans le noyau et conduit à la survie et à la croissance des lymphocytes B infectés par l'EBV. LMP1 : Latent Membrane Protein 1 ; TRAF : TNF Receptor Associated Factor ; JAK : JAnus Kinase ; RIP : Receptor-Interacting Protein kinase ; TRADD : Tumor necrosis factor Receptor type 1-Associated Death Domain ; NIK : NF- κ B Induced Kinase ; IKK : I κ B Kinase ; STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription ; JNK : C-Jun N-terminal Kinases ; AP-1 : Activator Protein-1 ; NF- κ B : Nuclear Factor – kappa B ; PXQXT : Motif Pro – Xaa – Gln – Xaa – Thr. D'après (Thorley-Lawson, 2001).

VI.3.A.2. c-Myc

Keiser et al ont identifié que c-Myc est une cible directe de EBNA2 (Kaiser et al., 1999). Comme énoncé dans le paragraphe précédent, c-Myc est l'un des deux facteurs majeurs de transcription du programme de la latence III. Dans le transcriptome établi grâce à une puce « lymphome », il a été montré que la plupart des gènes induits sont régulés positivement par c-Myc, et impliqués dans la prolifération cellulaire. L'inactivation de c-Myc par le biais d'un inhibiteur chimique conduit à l'arrêt de prolifération des LCLs, ce qui confirme les données obtenues par transcriptomique (Faumont et al., 2009).

Plus récemment, David A et al ont montré que la surexpression de c-Myc conduit à la prolifération des cellules B immortalisées en programme de latence III, d'une manière dépendante de NF- κ B (David et al., 2017). C-Myc apparaît comme un acteur majeur de la prolifération des cellules B immortalisées par l'EBV.

VI.3.A.3. PI3K/AKT

Selon Dawson et al, LMP1 stimule l'activité de PI3K, en induisant la phosphorylation et l'activation de Akt (cible située en aval de PI3K) et en favorisant la survie cellulaire (Dawson et al., 2003). En plus de bloquer la transduction du signal BCR, LMP2A active la voie PI3K/Akt, en induisant la phosphorylation de Akt. L'activation de cette voie de signalisation agit comme un signal de survie des cellules B et des cellules épithéliales infectées. LMP2A est capable d'inhiber l'apoptose médié par l'immunosuppresseur TGF- β 1, dont le niveau d'expression est augmenté dans de nombreux cancers liés à l'EBV (Fukuda and Longnecker, 2004).

Selon Wang et ses coéquipiers, la protéine membranaire LMP1 favorise la phosphorylation d'IRF4 (Interferon Regulatory Factor), et que la famille des protéines kinases Src favorise l'activation d'IRF4 par LMP1. Les auteurs ont découvert que Src agit en amont de PI3K pour l'activation de IRF4 et de Akt (Wang et al., 2016a).

La **Figure 20** représente le détournement de la voie PI3K/Akt par LMP1.

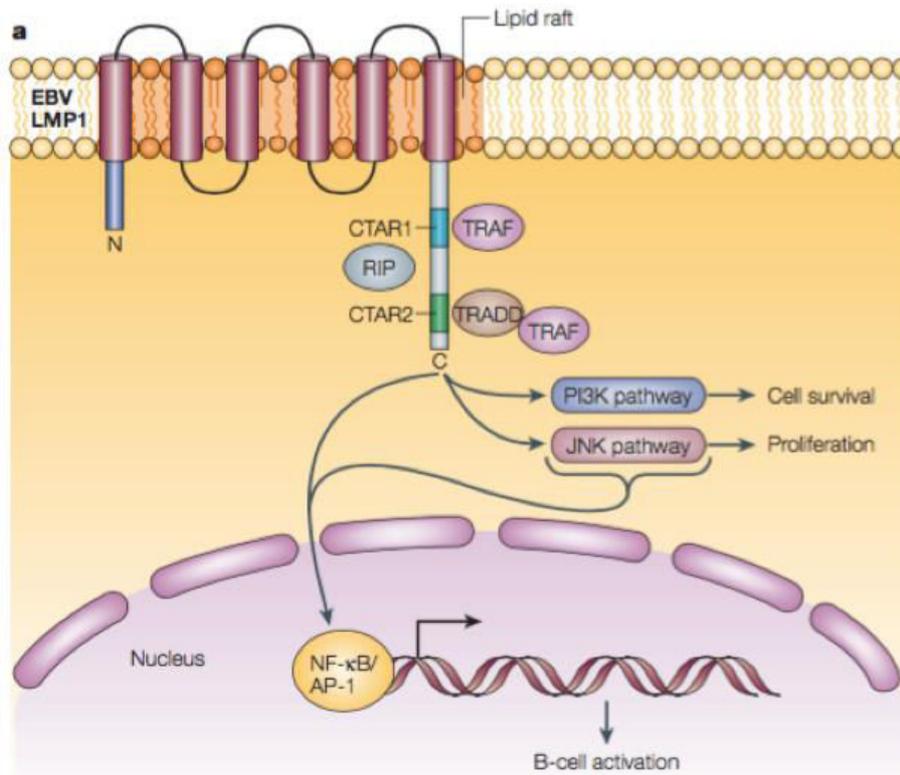


Figure 20 : Détournement de la voie PI3K/Akt par LMP1.

La protéine membranaire LMP1 peut interagir avec différentes protéines TRADD et TRAF, conduisant à l'activation des cellules B par l'induction des facteurs de transcription AP-1 et NF-κB. Les voies PI3K et JNK sont consécutivement activées, ce qui permet la survie cellulaire et la prolifération des lymphocytes B infectés, respectivement. D'après (Damania, 2004).

VI.3.A.4. JNK

Comme indiqué dans le paragraphe précédent, la protéine membranaire LMP1 conduit à l'activation de la voie JNK, par l'activation en aval des protéines TRAF et TRADD (Damania, 2004). Eliopoulos et *al* ont identifié que TRAF1 est un régulateur essentiel de la signalisation JNK par le domaine de liaison TRAF de LMP1 (Eliopoulos et al., 2003). LMP1 augmente l'activité des voies de signalisation JNK, p38, ERK et la voie canonique de NF-κB, via son domaine CTAR1/TES1 (Greenfeld et al., 2015). La partie C-terminale de LMP1, CTAR2, est essentielle pour l'activation de la voie JNK, impliquant les protéines TRAF et TRADD (Eliopoulos et al., 1999a).

Les travaux de Park et *al* ont montré que les cellules B infectées par l'EBV surexpriment le cluster de différenciation CD47, responsable de l'arrêt des cellules infectées en phase G1 *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène, l'activation des voies MAPK/JNK, et la surexpression de la protéine Tap73 (Park et al., 2014, revue).

VI.3.A.5. Les STATs

La corrélation entre l'activation constitutive des protéines STATs dans des lignées immortalisées par l'EBV, ainsi que dans des lymphomes primaires et les cellules issues de leucémie myéloïde fut établie par Weber-Nordt et ses collaborateurs (Weber-Nordt et al., 1996). Zhang et *al* ont montré que des niveaux élevés d'expression des protéines STAT-1, -2, -3 et 5A sont associés à la latence de type III de l'EBV (Zhang et al., 2004). LMP1 est responsable de l'induction des STAT-1, -2, -3, et l'expression de STAT-1 peut être impliquée dans le processus de transformation des lymphocytes B (Zhang et al., 2004).

De nombreuses tumeurs malignes liées à l'EBV, y compris les PTLDs, sont caractérisées par une dérégulation de la voie Jak/STAT (Vaysberg et al., 2009, revue). La signalisation de LMP1 induit la production de l'IFN- γ , qui, par une voie autocrine, conduit à la phosphorylation des résidus Tyrosines de STAT1 et à l'expression des gènes cibles de cette dernière (Najjar et al., 2005).

VI.3.A.6. P38/MAPK

Eliopoulos et ses collaborateurs ont identifié que LMP1 conduit à l'activation de la voie P38/MAPK, induisant l'expression des interleukines 6 et 8 (Eliopoulos et al., 1999b). La voie de signalisation de P38 conduit également à la surexpression de LMP1 (Johansson et al., 2010). Les auteurs suggèrent que la surexpression de LMP1 est augmentée par une boucle de régulation autocrine (Johansson et al., 2010). CD70, le ligand de CD27 (molécule de co-stimulation) est surexprimé à la surface de cellules malignes EBV-positives, y compris les PTLDs (Trentin et al., 1997). L'interaction de CD70 avec les cellules B immortalisées par l'EBV déclenche l'apoptose médiée par le stress du réticulum endoplasmique (RE), par le biais de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et de l'activation des voies P38/MAPK et JNK. Ces travaux révèlent d'autres mécanismes d'apoptose dirigés par le biais de CD70 (Park et al., 2010).

Partie 2 : Réponse immune anti-EBV et rupture de l'équilibre hôte/virus

I/ Immunosurveillance de l'EBV

Environ 95% des adultes sont infectés par l'EBV dans le monde. Pourtant, tous les individus ne développent pas de pathologies associées à ce virus. Un hôte immunocompétent est capable d'héberger le virus tout au long de sa vie, en établissant un équilibre hôte/virus. Le système immunitaire d'un hôte immunocompétent est en mesure de contrôler la prolifération des cellules infectées par l'EBV. Les mécanismes de surveillance qui permettent aux individus porteurs de l'EBV de ne pas développer de pathologies en rapport sont étudiés depuis des décennies. L'immunosurveillance de l'EBV par l'hôte peut s'établir de différentes façons : par l'immunité innée et adaptative. Elle peut également être à médiation cellulaire ou humorale. L'immunosurveillance à médiation cellulaire est la résultante d'une interaction entre une réaction immunitaire acquise et innée, dont les effecteurs sont en particulier les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK. L'immunité à médiation humorale et adaptative correspond à la production d'anticorps anti-EBV.

Les paragraphes suivants feront l'objet de l'immunosurveillance de l'hôte concernant l'EBV, principalement sous sa forme latente. Une première partie sera consacrée à l'immunité innée, puis l'immunité adaptative sera abordée sur les plans cellulaire et humoral.

I.1. Immunité innée

I.1.A. Par les monocytes et les cellules dendritiques

Les TLRs jouent un rôle crucial dans la réponse innée anti-EBV. L'activation des cellules dendritiques par les TLRs, est capable « d'alarmer » le système immunitaire en cas d'infection primaire par l'EBV (Finberg et al., 2005).

L'activation des TLR2 permet la reconnaissance des virions de l'EBV. Geudreault et *al* ont montré que l'EBV induit la sécrétion de la protéine MCP-1 (Monocyte Chemotactic Protein-1), nécessaire pour la réponse des monocytes primaires contre l'EBV par l'intermédiaire de TLR2 (Gaudreault et al., 2007).

Les cellules dendritiques (DCs) forment une première barrière contre le virus. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont décrites comme source majeure de cytokines antivirales IFN- α et β de type I (Reizis et al., 2011).

Fiola et ses collaborateurs ont montré que le TLR9, activé par l'ADN viral, contribue à la reconnaissance de l'EBV par les populations monocytaires et dendritiques. Cette réponse médiée par TLR9 est orchestrée différemment dans les monocytes primaires et les cellules dendritiques. Elle permet la reconnaissance virale et l'induction de la réponse dirigée contre l'EBV (Fiola et al., 2010).

1.1.B. Par les cellules NK

La plupart des données relatives aux événements immunologiques se déroulant pendant l'infection primaire par l'EBV proviennent de l'étude des patients atteints par la mononucléose infectieuse. Williams et al ont découvert que le nombre de cellules NK est augmenté chez les patients atteints de MNI, ainsi que le premier mois qui suit le diagnostic de cette maladie. Les cellules NK jouent un rôle important dans le contrôle de l'infection primaire par l'EBV en éliminant les cellules B infectées, grâce à l'augmentation de la réponse T spécifique dirigée contre les antigènes du virus. La stimulation de cette réponse immune T s'établit *via* la libération de cytokines immunomodulatrices, telles que l'IFN- α , - β et - γ (Biron et al., 1999; Williams et al., 2005).

Des études effectuées *in vitro* ont révélé que les cellules NK peuvent inhiber la transformation des lymphocytes B par l'EBV par le biais de l'interféron-gamma (IFN- γ) si elles sont ajoutées quelques jours après l'infection, (Lotz et al., 1985). Wilson et Morgan ont montré que les cellules NK et les lymphocytes T CD4+ issus du sang de cordon ombilical sont capables d'inhiber la transformation des lymphocytes B par l'EBV *in vitro* (Wilson and Morgan, 2002). Ils prouvent que les lymphocytes activés T CD4+ et les cellules NK CD16-positives sont indépendamment capables de tuer les cellules des LCLs autologues. Ils concluent que les réponses primaires menées contre l'EBV par les cellules NK et les lymphocytes CD4+ peuvent limiter l'expansion des cellules B infectées par l'EBV *in vitro* (Wilson and Morgan, 2002). Les lymphocytes T CD4+ peuvent tuer les cellules B infectées par différents mécanismes, comprenant l'interaction entre Fas et Fas Ligand, les granzymes, et la perforine (Wilson et al., 1998).

Les cellules NK limitent le passage de la phase de latence au cycle lytique chez les cellules infectées. En effet, l'expression diminuée du CMH de classe I à la surface des

cellules lytiques les sensibilise à la reconnaissance et à la mort par les cellules NK (Pappworth et al., 2007).

L'équipe de Sánchez Martínez a mis en évidence que les cellules NK humaines de donneurs sains, activées *in vitro* par des cellules lymphoblastoïdes EBV-positives présentent un potentiel cytotoxique et prolifératif amélioré par rapport à d'autres modèles d'activation, comme par exemple l'activation des cellules K562 par l'IL-2 (Sánchez-Martínez et al., 2015) (Sánchez-Martínez et al., 2015).

Gosselin et ses collaborateurs ont prouvé que l'interleukine-15 (IL-15) est un acteur essentiel pour l'activation des cellules NK, permettant la médiation des réponses antivirales dirigés contre différents virus, dont l'EBV (Gosselin et al., 1999). L'IL-15 peut être sécrétée par divers types cellulaires, tels que les monocytes/macrophages, les cellules stromales de la moelle osseuse, les kératinocytes et les cellules dendritiques. Cette cytokine déclenche la synthèse de l'IFN- γ à partir des cellules NK et des lymphocytes T CD4+, qui peuvent agir de manière autocrine et paracrine pour moduler le potentiel cytotoxique des cellules NK. L'IL-15 peut contribuer de deux manières à l'établissement d'une réponse antivirale: en augmentant le potentiel d'élimination des cellules NK, et en stimulant la synthèse et la sécrétion de l'IFN- γ (Gosselin et al., 1999).

Lünemann et ses collaborateurs ont découvert une sous-population de cellules NK, situées au niveau des amygdales, caractérisées par les marqueurs CD56^{Fort} NKG2A⁺ CD94⁺ CD54⁺ CD62L⁻ et une forte sécrétion d'IFN- γ . Elles s'accumulent dans les amygdales des porteurs de l'EBV, et sont capables de limiter efficacement la transformation des cellules par le virus (Lünemann et al., 2013). Jud et al ont montré que la sous-population des cellules NK CD56^{Fort} exprimant NKG2A (récepteur de la famille des lectines) au sein des amygdales est essentielle pour éliminer le virus *in vitro* (Jud et al., 2017). Le NGK2A se dimérise avec le CD94 pour former un récepteur inhibiteur (López-Botet et al., 1997). La libération de l'IFN- γ par l'engagement partiel de la protéine NKp44 des cellules NK CD56^{Fort} et positives pour NKG2A contribue à l'inhibition de la transformation des lymphocytes B par l'EBV (Jud et al., 2017).

Une étude menée par Chaigne-Delalande et al indique que le magnésium (Mg²⁺) est essentiel pour les fonctions cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8+, afin d'éliminer les cellules B infectées par l'EBV. Ils prouvent que ce processus s'établit grâce à la protéine NKG2D (Natural Killer Group 2D), et révèlent ainsi une fonction importante du magnésium dans l'immunité antivirale contre l'EBV (Chaigne-Delalande et al., 2013).

Song et son équipe ont découvert que l'enzyme IDO (Indoléamine 2,3-DiOxygénase) produite par les lymphocytes B infectés par l'EBV inhibe l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK, par la voie de signalisation JNK. Ces données fournissent un mécanisme potentiel par lequel l'EBV pourrait échapper au système immunitaire par l'intermédiaire de la protéine NKG2D des cellules NK (Song et al., 2011).

Une sous-population particulière de cellules NK des amygdales a été décrite par Strowig et ses collaborateurs. Ces cellules sont activées par les cellules dendritiques, elles sécrètent fortement l'IFN- γ et ont la capacité d'inhiber la transformation des cellules B par l'EBV *in vitro*. Ces données suggèrent que l'activation des cellules NK par les cellules dendritiques peut limiter l'infection primaire de l'EBV dans les amygdales jusqu'à ce que l'immunité adaptative établisse un contrôle immunitaire de ce virus oncogénique (Strowig et al., 2008).

I.2. Immunité adaptative

La reconnaissance des antigènes viraux conduit à l'élaboration de réponses immunitaires spécifiques qui contrôlent la prolifération des cellules infectées par l'EBV. La caractéristique principale de l'immunité adaptative résulte en la capacité des cellules mémoires à médier des réponses plus ciblées et plus efficaces que les réponses apportées par les acteurs de l'immunité innée. Les immunités cellulaire et humorale jouent un rôle essentiel dans le contrôle des phases primaires et persistantes de l'infection virale.

I.2.A. Immunité adaptative à médiation cellulaire

L'immunité adaptative à médiation cellulaire représente une barrière robuste contre l'EBV, comme le montrent les lymphoproliférations des déficits immunitaires associés à l'EBV (Palendira et al., 2012; Taylor et al., 2015). Le paragraphe qui suit fait un bilan des différents acteurs de l'immunité acquise à médiation cellulaire, comme du rôle des lymphocytes T CD8+ et CD4+.

I.2.A.1. Par les lymphocytes T CD8+

I.2.A.1.a. Primo-infection chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse

La MNI est sans doute une réaction exacerbée du système immunitaire. Sous cette réserve, pouvoir suivre les patients atteints de mononucléose infectieuse depuis le moment de

l'infection aiguë jusqu'à la convalescence est très instructif en ce qui concerne l'évolution de la réponse des lymphocytes T CD8+ contre l'EBV. Le nombre inhabituellement élevé de lymphocytes CD8+ observé lors de la phase aiguë de la maladie conduit à deux hypothèses : soit ces cellules s'expandent de manière non spécifique (McNally and Welsh, 2002), soit elles proviennent d'une réponse polyclonale à un superantigène codé par le virus (Sutkowski et al., 2001).

Les lymphocytes T CD8 sont essentiellement dirigés contre les protéines du cycle lytique de l'EBV, ils représentent 1 à 40% de la population totale T CD8+ (Steven et al., 1997). Les réponses aux antigènes de latence sont plus faibles, les cellules CD8 ciblent majoritairement les protéines EBNA3A, -3B et -3C et représentent 0,1 à 1% de la population lymphocytaire T CD8+ totale (Steven et al., 1996).

Ces lymphocytes T CD8 sont positifs pour la perforine et possèdent des fonctions cytotoxiques *ex vivo* (Callan et al., 2000). Tamaru et al ont montré qu'ils possèdent un phénotype de lymphocytes T activés (CD45RO+), exprimant faiblement la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui les sensibilise à la mort par apoptose (Tamaru et al., 1993).

1.2.A.1.b. Primo-infection chez les patients asymptomatiques

Il existe une augmentation modérée des lymphocytes T CD8 anti-EBV chez les patients asymptomatiques, représentant environ 15% des lymphocytes T CD8+ totaux, dont 2 à 5 % de cellules mémoires T CD8+ spécifiques du virus (Hislop et al., 2007b).

1.2.A.1.c. Après la primo-infection

Après être guéris de la mononucléose infectieuse, la fréquence des lymphocytes T CD8+ spécifiques de l'EBV diminue chez la plupart des patients. Cependant, cette population lymphocytaire peut être détectée trois ans après résolution de l'infection. Hislop et ses collaborateurs ont étudié le phénotype des lymphocytes T CD8 chez des patients ayant une MNI et après guérison. Les cellules T CD8 dirigées contre les protéines du cycle lytique passent d'un phénotype CD45RA- CD45RO+ CCR7- (durant la MNI) à un profil d'expression CD45RA+ CD45RO- après résolution des signes cliniques de la maladie. Quant aux cellules T CD8 dirigées contre les protéines de latence, elles demeurent avec un phénotype de lymphocytes T activés CD45RA- CD45RO+, et acquièrent l'expression de CCR7. Ces différences phénotypiques permettent de distinguer si les réponses sont dirigées contre les protéines du cycle lytique ou de la latence de l'EBV (Hislop et al., 2002).

Selon Ouyang et ses collaborateurs, il existe une augmentation des réponses dirigées contre l'EBV corrélée avec l'âge des patients. Ainsi, les personnes âgées (>87 ans dans cette étude) peuvent avoir jusqu'à 14% de lymphocytes T CD8+ anti-EBV. Ces données pourraient expliquer l'augmentation de l'incidence des décès causés par des virus chez les personnes âgées (Ouyang et al., 2003). Il existe une corrélation entre l'expansion des cellules T CD8+ et des niveaux élevés de cytokines à la fois pro-inflammatoires (IFN- γ , TNF, IL-6) et immunorégulatrices (IL-10, TGF- β) (Panikkar et al., 2015).

I.2.A.2. Par les lymphocytes T CD4+

I.2.A.2.a. Primo-infection chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse

La réponse spécifique contre l'EBV par les lymphocytes CD4+ est moins étudiée que celle des cellules T CD8 dans la littérature. Comme cité précédemment, les lymphocytes T CD4+ du sang de cordon (lymphocytes T primaires naïfs) ont une capacité intrinsèque à tuer les cellules B infectées par l'EBV. Contrairement aux lymphocytes T CD8+, le pourcentage de cellules T CD4+ est peu augmenté durant la phase aiguë de la mononucléose infectieuse (Amyes et al., 2003). Lors de la MNI, les lymphocytes T CD4 spécifiques du virus représentent seulement 1% de l'ensemble des lymphocytes T CD4+ circulants.

Les lymphocytes T CD4 spécifiques de l'EBV expriment les molécules de co-stimulation CD27 et CD28 (phénotype de lymphocytes T naïfs). Les cellules T CD4+ spécifiques des antigènes du cycle lytique expriment avec une fréquence plus élevée un des marqueur des lymphocytes T naïfs, CD45RA, par comparaison aux lymphocytes T CD4 spécifiques des protéines de latence (Amyes et al., 2003).

Long et *al* ont étudié les réponses T CD4 spécifiques de l'EBV, et ont montré que l'antigène de latence EBNA2 constitue une des cibles principales des lymphocytes T CD4+ spécifiques de l'EBV chez les patients atteints de MNI (Long et al., 2013).

Une autre étude menée *in vitro* par Precopio et ses collaborateurs révèle que les réponses par les lymphocytes T CD4 sont principalement dirigées contre EBNA3 (Precopio et al., 2003). La fréquence des réponses des lymphocytes T CD4+ anti-EBV est positivement corrélée avec la charge virale de l'EBV, suggérant que les réponses de ces lymphocytes T CD4 sont conduites par des antigènes viraux (Precopio et al., 2003).

Toutefois, plusieurs études prouvent que les porteurs sains de l'EBV possèdent des épitopes CD4+ anti-EBNA1, se composant de sous-groupes distincts de cellules mémoires.

Ces études révèlent que les réponses de type Th1 et Th2 sont impliquées pour cibler l'antigène EBNA1 (Heller et al., 2007; Münz et al., 2000; Steigerwald-Mullen et al., 2000). Ces lymphocytes T4 peuvent reconnaître et tuer les cellules de LCLs dont les CMH sont compatibles, ainsi que les cellules de lymphomes de Burkitt positifs pour EBNA1 (Münz et al., 2000; Paludan et al., 2002; Voo et al., 2002).

1.2.A.2.b. Après la primo-infection

Après guérison de la MNI, le pourcentage de cellules T CD4 dirigées contre l'EBV représente environ 0,1% des lymphocytes T CD4 circulants. Cette population de lymphocytes T CD4+ effecteurs spécifiques de l'EBV persiste durant l'infection latente l'EBV tout au long de la vie de l'hôte (Amyes et al., 2003).

La **Figure 21** schématise les antigènes de latence préférentiellement ciblés par les lymphocytes T CD4+ et CD8+.

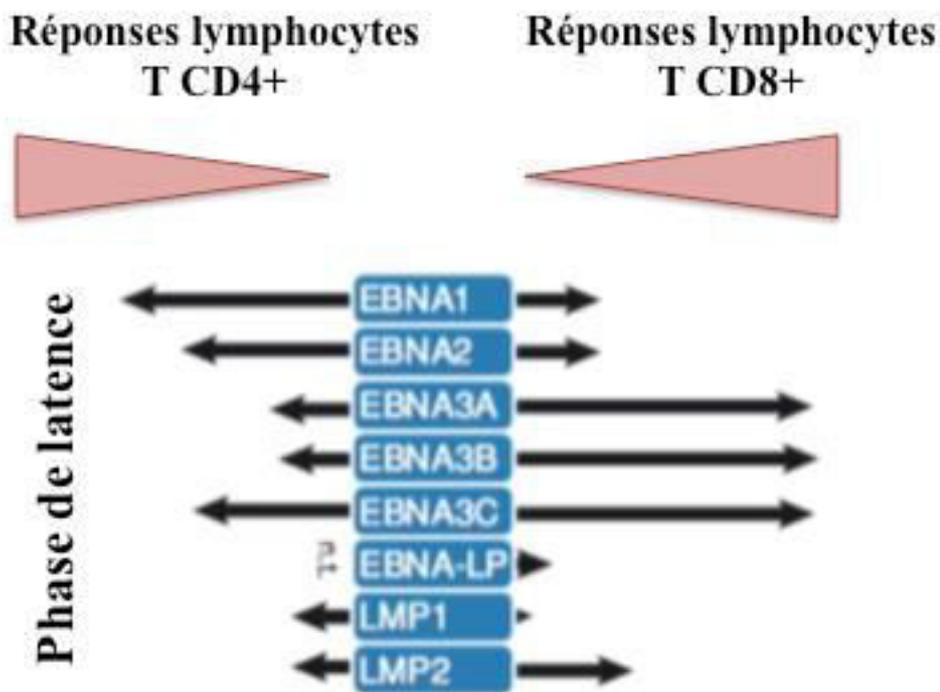


Figure 21 : Protéines de latence préférentiellement ciblées par les lymphocytes T CD4+ et CD8+.

Modifié d'après (Hislop et al., 2007b)

1.2.B. Immunité adaptative à médiation humorale

Les réponses immunitaires médiées par les anticorps sont nécessaires pour générer une réponse immunitaire efficace contre les infections virales (Tangye and Tarlinton, 2009). La séro-épidémiologie de l'infection par l'EBV et des pathologies associées à l'EBV est basée sur un ensemble de tests immunologiques initialement développés par Henle et Klein dans les années 1960s (Evans and Niederman, 1989). Actuellement, les tests mesurent les réponses médiées par les anticorps dirigés contre les protéines EBNA (phase latente), les antigènes viraux précoces EA-D et EA-R (EAs : early antigens) exprimés par les cellules durant le début du cycle lytique, les antigènes de la capsid virale (VCAs : Viral Capsid Antigens) exprimés tardivement lors du cycle lytique, et les antigènes de membrane (MAs : membrane antigens), présents à la surface des cellules lors du cycle lytique tardif.

Le diagnostic de la primo-infection de l'EBV, la MNI, est basé sur la détection d'anticorps dirigés contre les protéines de l'EBV. Dans un premier paragraphe, nous étudierons la réponse immunitaire à médiation humorale lors de la primo-infection. Un second paragraphe sera consacré aux réponses immunitaires durant l'infection persistante. Enfin, les cas particuliers seront présentés dans une dernière partie.

1.2.B.1. Chez les patients atteints par la mononucléose infectieuse

Les réponses immunitaires exacerbées chez les patients atteints par la MNI ont permis d'approfondir les recherches concernant les réponses primaires contre l'EBV médiées par les anticorps (Pedneault et al., 1996). La plupart des patients atteints par la mononucléose infectieuse ont des titrations élevées en immunoglobulines M (IgM) dirigées contre les protéines VCA, suivie d'une hausse des IgG dirigées contre les VCAs et les EAs (principalement EA-D). Par la suite, les IgMs dirigés contre les VCAs disparaissent durant la convalescence ou dans les mois qui suivent la primo-infection, tandis que la titration des IgGs anti-VCA atteint un pic, puis chute lentement durant les mois suivants pour atteindre un niveau stable. Les IgG dirigées contre les protéines EA chutent plus rapidement et davantage que les IgG anti-VCA, et deviennent non détectables ou demeurent à un très faible niveau (Henle and Henle, 1976).

Les anticorps neutralisants le virus durant la phase aiguë de la MNI ont des titrations faibles, comme pour les IgM dirigées contre la glycoprotéine virale gp350. Les IgG dirigées contre la gp350 apparaissent tardivement dans la maladie.

Durant la phase aiguë de la MNI, la plupart des patients possèdent une réponse IgG dirigée contre la protéine EBNA2, alors que la réponse IgG anti-EBNA1 n'est généralement pas détectable avant la convalescence (Henle et al., 1987).

La phase précoce de la MNI est généralement associée à des niveaux élevés en IgM, IgG et IgA dans le sérum total (Henle and Henle, 1979). Cette activation des cellules B polyclonales peut être directement dirigée par l'infection des cellules B (Garzelli et al., 1984), ou induite par une réponse des lymphocytes T auxiliaires aberrante, comme observé dans d'autres infections virales aiguës (Recher et al., 2004).

1.2.B.2. Lors de l'infection persistante

Les porteurs sains du virus sont constamment positifs pour les IgG anti-VCA, les anticorps neutralisants anti-gp350 et les anticorps anti-EBNA1 (Evans and Niederman, 1989; Henle and Henle, 1979). Un nombre significatif de porteurs sains possède des réponses immunitaires supplémentaires, par exemple des anticorps dirigés contre les EA (EA-R plus fréquemment) ou contre une ou plusieurs des protéines EBNA, ces réponses étant stables dans le temps. Le profil sérologique des individus peut être un marqueur utile pour identifier une infection ancienne. La **Figure 22** représente les différentes réponses dirigées contre l'EBV durant les phases d'incubation, de la MNI aiguë et de la convalescence, dans le cas d'un porteur sain et dans le cas d'un individu immunodéprimé.

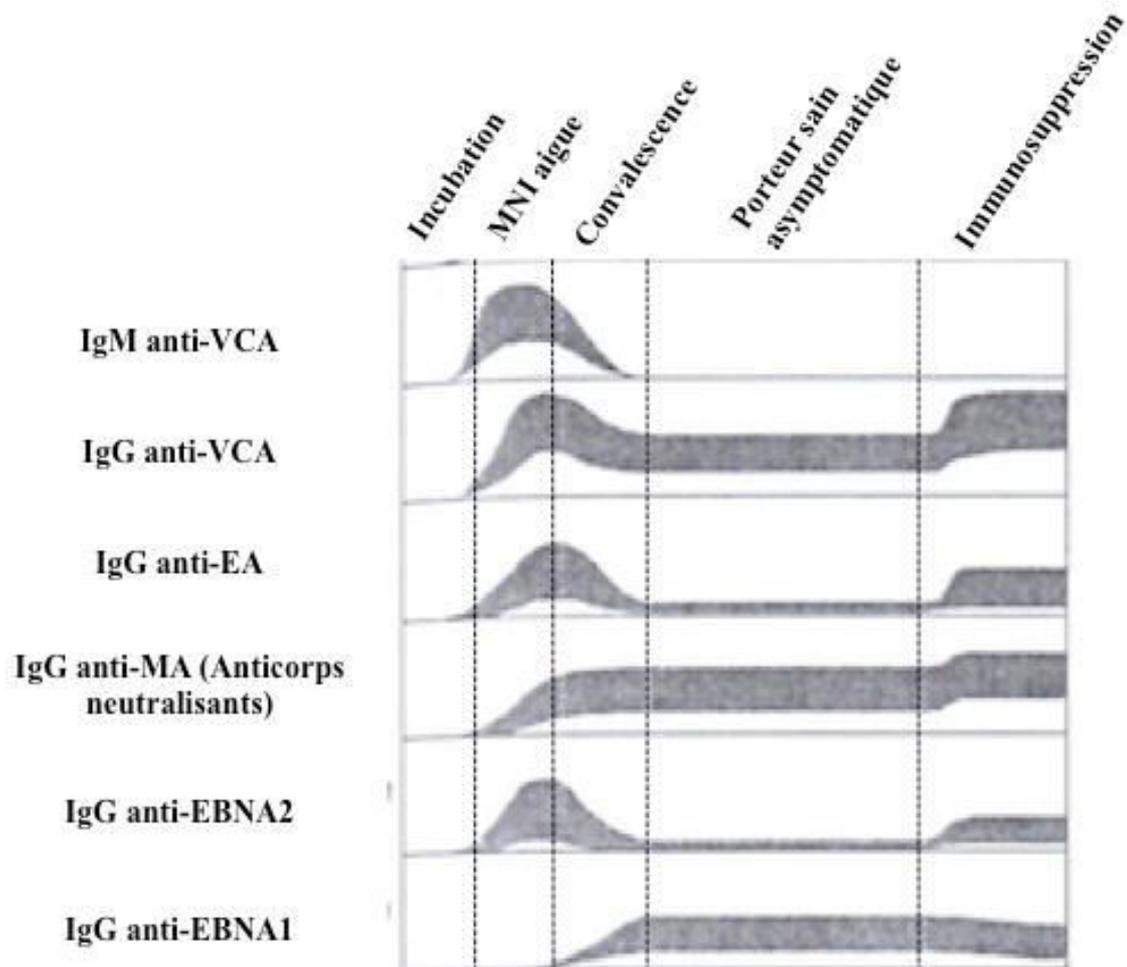


Figure 22 : Réponses immunitaires médiées par les anticorps lors des différentes phases de l'infection par l'EBV.

Ig : Immunoglobuline ; VCA : Antigène de la capsid virale ; EA : Antigène précoce ; MA : Antigène de la membrane ; EBNA : Antigène nucléaire du virus d'Epstein-Barr ; MNI : Mononucléose infectieuse. Modifié d'après (Fields et al., 2007).

1.2.B.3. Cas particuliers

Une étude menée sur une cohorte de jeunes individus séronégatifs montre que la vaccination à l'aide de gp350 recombinante n'empêche pas leur infection par l'EBV, mais les symptômes de la mononucléose infectieuse sont diminués (Sokal et al., 2007). Ces données suggèrent que bien que des anticorps spécifiques à l'EBV soient produits après l'infection, ces derniers peuvent influencer la gravité de la maladie plutôt que de prévenir l'infection virale. Ces résultats peuvent constituer un challenge pour la conception de vaccins efficaces et durables contre l'EBV (Cohen, 2015).

La quantité importante d'anticorps dirigés contre la structure du virus et les antigènes lytiques indique la présence d'une réactivation virale sporadique des cellules en latence, ou l'apparition de nouvelles cellules infectées au niveau de la tumeur de NPC et de son microenvironnement. Les IgG et IgA spécifiques de l'EBV ont été retrouvées dans le sérum de patients atteints de NPC. Ces anticorps reconnaissent diverses cibles de l'EBV, y compris les antigènes de structure de l'EBV (par exemple les protéines antigéniques de la capsid virale VCA-p18, VCA-p40,97 (Fachiroh et al., 2010), les glycoprotéines gp350/220 (Thorley-Lawson and Poodry, 1982), la gp78 (Gu et al., 2008)), les protéines du cycle lytique BRLF1 (BamHI Rightward reading Frame 1) (Feng et al., 2000) et BZLF1 (BamHI Leftward reading Frame 1) (Joab et al., 1991), comme cela a été démontré dans une étude effectuée sur une population d'hommes taiwanais atteints de NPC (Chien et al., 2001). EBNA1 et les protéines membranaires LMPs peuvent également être détectées (Paramita et al., 2011).

Chez certains patients atteints de NPC, il existe une réponse plus forte des anticorps IgG1 contre EBNA1, comparé aux réponses induites contre LMP1, LMP2, et BARF1 (BamHI-A Rightward Fragment 1). De faibles quantités d'IgA ont été retrouvées avec pour cibles LMP1, LMP2 et BARF1. Aucune trace d'IgA n'a été mise en évidence contre EBNA1 (Paramita et al., 2011).

L'immunogénéité marginale des LMPs et de BARF aux réponses immunitaires humores peut être due à leurs propriétés intrinsèques. Par exemple, la sécrétion rapide et complète de BARF1 conduit à la présence de peu de protéines à l'intérieur ou à la surface des cellules permettant leur détection (de Turenne-Tessier et al., 2005), et il existe une expression limitée de LMP1 à la surface des cellules.

II/ Rupture de l'équilibre hôte/virus

II.1. Cancers solides et lymphoproliférations liés à l'EBV

L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé en 1997 l'EBV comme « agent cancérogène » de groupe I. Ce virus peut être à l'origine de plusieurs types de cancers, qui peuvent varier en fonction du statut du système immunitaire de l'hôte. Il peut être à l'origine de diverses tumeurs, tels que les cancers solides (cancer de l'estomac, carcinome nasopharyngé...), ou les cancers lymphatiques (lymphome de Burkitt, maladie de Hodgkin, lymphome T/NK...). Un premier paragraphe portera sur les cancers solides associés à l'EBV, et une autre partie sera dédiée aux désordres lymphoprolifératifs des lymphocytes B liés à

l'EBV chez les individus immunocompétents, ou chez ceux présentant des déficits immunitaires innés ou acquis.

II.1.A. Cancers solides liés à l'EBV

L'EBV peut infecter les cellules épithéliales de l'hôte, et conduire à l'émergence de cancers solides, tels que les carcinomes gastriques et les carcinomes nasopharyngés.

II.1.A.1. Carcinome gastrique

En 1990, le génome de l'EBV a été détecté dans des carcinomes gastriques, par la présence d'EBER1 (Burke et al., 1990). Les cellules issues des cancers gastriques associés à l'EBV (EBVaGC) sont majoritairement en programme de latence I de l'EBV. Elles expriment les BARTs, les EBERs, EBNA1. Dans 40% des cas, elles expriment également LMP2A et sont en programme de latence II de l'EBV (Imai et al., 1994).

Les EBVaGC représentent environ 10% des carcinomes gastriques dans le monde (Takada, 2000). Les tumeurs EBV-positives présentent des mutations fréquentes du gène *PIK3CA* (impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire), une hyperméthylation de l'ADN, et une expression augmentée de PD-L1 et PD-L2 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2014).

II.1.A.2. Carcinome nasopharyngé

En 1973, l'ADN de l'EBV a été détecté par hybridation *in situ* dans des cellules tumorales issues de NPC (Wolf et al., 1973).

Les NPC sont les tumeurs les plus fréquentes du nasopharynx, et représentent 40 à 50% des tumeurs malignes du nasopharynx chez les enfants (Deutsch et al., 1978). L'OMS a classé les NPC en trois sous-types histologiques principaux, basés sur leur degré de différenciation : le carcinome épidermoïde kératinisant (type 1), le carcinome non kératinisant (type 2), et le carcinome indifférencié (type 3) (Shanmugaratnam and Sobin, 1993). Les tumeurs de type 2 et 3 sont principalement positives pour l'EBV (Pathmanathan et al., 1995; Wei et al., 2011). Les cellules issues de NPC se trouvent en programme de latence II de l'EBV, et expriment les protéines de latence virale EBNA1, LMP1 et LMP2. Ces deux protéines membranaires jouent un rôle crucial dans l'émergence du carcinome nasopharyngé (Dawson et al., 2012).

II.1.B. Lymphoproliférations liées à l'EBV

II.1.B.1. Chez les hôtes immunocompétents

Lorsque les individus sont immunocompétents, un équilibre entre l'hôte et le virus s'établit, le système immunitaire de l'hôte étant capable de contrôler la prolifération des cellules infectées par le virus. En cas de déficit immunitaire de l'hôte, cet équilibre se rompt et il peut y avoir émergence de lymphomes. Les lymphomes B liés à l'EBV pouvant émerger chez les hôtes immunocompétents sont présentés dans le **Tableau 3**.

Type de lymphome	Fréquence de l'EBV	Programme de latence
Lymphome de Burkitt (endémique)	100%	I
Lymphome de Burkitt (sporadique)	20-30%	I
Lymphome de Hodgkin (LH)	40%	II
DLBCL associé à une inflammation chronique	≈70%	II
DLBCL EBV-positif chez les personnes âgées	100%	II
Granulomatose lymphomatoïde	100%	II

Tableau 3 : Lymphomes B associés à l'EBV chez les sujets immunocompétents.

Modifié d'après (Roschewski, 2012, revue).

II.1.B.1.a. Le lymphome de Burkitt

Le lymphome de Burkitt (LB) est un lymphome très agressif associé à la surexpression de *MYC* suite à la translocation entre le chromosome 8 et l'un des gènes de l'immunoglobuline sur les chromosomes 14 (plus fréquemment), 2 ou 22. Il s'agit du lymphome le plus fréquent chez l'enfant parmi les lymphomes non-Hodgkiniens (Miles et al., 2012, revue). Les lymphomes de Burkitt peuvent être divisés en trois variants cliniques : les BL endémiques, sporadiques, et associés au déficit immunitaire. Ils comprennent des différences importantes au niveau de l'épidémiologie, de la manifestation clinique et de la biologie. Le BL endémique est surtout retrouvé dans les pays en voie de développement, tels que l'Afrique équatoriale et la Papouasie-Nouvelle-Guinée. L'EBV est détecté dans les cellules néoplasiques chez quasiment 100% des patients atteints de ce type de lymphome. A contrario, le génome de l'EBV n'est retrouvé que dans 20 à 30% des formes sporadiques du BL (Thorley-Lawson and Gross, 2004). Le génome du virus est détecté dans 40% à 70% des

cellules issues de patients présentant des déficits immunitaires. Les lymphomes de Burkitt possèdent un phénotype de latence de type I, caractérisé en particulier par l'expression de la protéine nucléaire EBNA1 (Saha and Robertson, 2011).

La charge virale de l'EBV est augmentée lorsque les patients sont infectés par le paludisme. Cette augmentation est probablement liée à la réactivation virale due aux antigènes du paludisme. L'immunophénotype d'une cellule de LB est comparable à celui d'une cellule centrale germinale ($BCL6^+$, $CD10^+$). Une infection persistante du paludisme favorise l'hyperactivation de ces centres germinatifs, augmentant ainsi le risque d'hypermutation somatique et de translocation de *MYC* (Chene et al., 2009). L'augmentation de la charge virale de l'EBV et l'activation concomitante des cellules B polyclonales associées à une survie accrue des cellules B peuvent augmenter le risque de développement de LB endémique chez les enfants vivant dans des zones à risque du paludisme (Chene et al., 2009).

Les progrès récents dans l'étude du profil transcriptionnel des LB ont amélioré la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents de l'apparition de ce lymphome, et ont permis de mieux caractériser son paysage mutationnel. Schmitt et ses collaborateurs ont montré que le facteur de transcription TCF-3 est central dans la pathogenèse du lymphome de Burkitt. Le TCF-3 est activé de manière constitutive de différentes manières : (i) par des mutations somatiques qui inactivent son régulateur négatif ID3 et (ii) par des mutations somatiques dans TCF-3 qui bloquent la capacité de ID3 à se lier à son facteur de transcription (Schmitz et al., 2014, revue).

Les thérapies actuelles n'utilisent pas systématiquement de traitement spécifique de l'EBV. Des chimiothérapies intenses et courtes ont été couplées à l'anticorps monoclonal CD20 Rituximab. Cette combinaison permet la rémission chez plus de 85% des patients, mais s'effectue au prix d'une toxicité myélosuppressive élevée (Thomas et al., 2006). La plupart des patients atteints d'un lymphome de Burkitt guérissent grâce à ce traitement intensif. Cependant, le pronostic vital reste médiocre chez les personnes âgées et dans les cas de rechutes (Casulo and Friedberg, 2015).

II.1.B.1.b. Le lymphome B Diffus à Grandes Cellules

Le Lymphome B Diffus à Grandes Cellules (DLBCL) est le lymphome B le plus fréquemment retrouvé. Il existe deux types de DLBCL, qui se distinguent selon leur origine : les GC-DLBCLs (Germinal Center), provenant du centre germinatif et les ABC-DLBCLs (Activated B-Cell).

L'infection par l'EBV est associée aux DLBCLs seulement dans 10% des cas chez les hôtes immunocompétents. Cependant, il existe des formes cliniques de DLBCL plus fréquemment associées à l'EBV : les DLBCLs associés à des inflammations chroniques ($\approx 70\%$ des cas), et les DLBCLs EBV-positifs chez les personnes âgées (100% des sujets). Ces deux types de lymphomes sont en programme de latence II de l'EBV (Roschewski, 2012, revue).

Selon Park et ses collaborateurs, l'association de l'EBV aux DLBCLs est corrélée à un plus mauvais pronostic de survie des patients, avec une réponse médiocre au traitement et une diminution de la survie globale (Park et al., 2007).

Les DLBCLs associés à une inflammation chronique sont classiquement corrélés au lymphome associé au pyothorax (PAL, Pyothorax-Associated Lymphoma). Ce dernier a été découvert pour la première fois en 1987, chez des patients traités pour la tuberculose avec induction d'un pneumothorax artificiel. 70% des cellules issues des patients étaient positives pour l'EBV (Aozasa, 2006; Fukayama et al., 1993).

Les DLBCLs EBV-positifs chez les personnes âgées sont des lymphomes agressifs survenant chez des patients ne présentant pas d'immunodéficience évidente et généralement âgés de plus de 50 ans (Castillo et al., 2016, revue). La plupart des patients présentent une atteinte extranodale. L'oncoprotéine LMP1 est détectée dans la majorité des cas, alors que EBNA2 est retrouvée dans seulement 25 à 35% des cas. La surexpression systématique de LMP1 pourrait en partie expliquer l'agressivité de ces lymphomes (Oyama et al., 2003). Les personnes âgées atteintes de DLBCL lié à l'EBV supportent difficilement des chimiothérapies agressives (Park et al., 2007).

II.1.B.1.c. Le lymphome de Hodgkin

Les personnes ayant fait une MNI ont plus de risques de développer un lymphome de Hodgkin que les sujets porteurs de l'EBV ne l'ayant pas eue (Hjalgrim et al., 2007). De même, une titration virale élevée est corrélée à un risque accru de développer un lymphome de Hodgkin au cours de sa vie (Mueller et al., 2012). Comme précédemment décrit, les principales cellules malignes du LH sont les cellules de Reed-Sternberg (R-S). Ces cellules sont dans 40 à 60% des cas EBV-positives et possèdent un phénotype de latence II (Weiss et al., 1989). Le pouvoir pathogène des cellules de R-S peut être expliqué par l'activation constitutive des voies canonique et non canonique de NF- κ B. LMP1 est un des acteurs activant la voie NF- κ B, en mimant CD40 (Küppers, 2009). La détection du génome de l'EBV présent dans les cellules de R-S, détectable dans le sang périphérique des patients atteints de LH est corrélée avec des facteurs pronostiques tels que le stade avancé de la maladie, l'âge avancé, le score pronostic international (ISS : Injury Severity Score), et une augmentation de la fréquence des macrophages CD68+. Un score ISS élevé peut constituer un biomarqueur du lymphome Hodgkinien (Hohaus et al., 2011; Steidl et al., 2010).

II.1.B.1.d. La granulomatose lymphomatoïde

La granulomatose lymphomatoïde (GL) est une maladie lymphoproliférative rare, qui se traduit par la présence de cellules B clonales atypiques EBV-positives et survient dans un contexte inflammatoire. Les patients ne présentent généralement pas d'immunodéficience manifeste avant le diagnostic. La transformation des lymphocytes B par l'EBV et la surexpression des chemokines telles que CXCL10 (C-X-C motif Ligand chemokine 10)/ IP-10 (Interferon gamma induced Protein 10)) et CXCL9 (C-X-C motif Ligand chemokine 9)/ MIG (Monokine Induced by gamma interferon) constituent des caractéristiques pathologiques majeures de ce lymphome (Jaffe and Wilson, 1997). L'atteinte pulmonaire survient dans 90% des cas, suivie par une atteinte des reins, de la peau et du cerveau (Ankita and Shashi, 2016).

La GL peut être divisée en trois grades, en fonction de la proportion de grandes cellules B EBV-positives et du phénomène de nécrose. Les cas de grades inférieurs (grades I et II) font l'objet de stratégies de traitement et de pronostic différents des lésions de grade III, qui possèdent des similitudes avec les lymphomes agressifs (Tagliavini et al., 2013). Les patients présentant des lésions de bas grade peuvent avoir des rémissions spontanées

occasionnelles sans traitement, alors que les sujets atteints de GL de haut grade connaissent généralement une évolution agressive de la maladie. La cause la plus fréquente de décès est l'atteinte pulmonaire progressive (Jaffe and Wilson, 1997).

Tous les patients atteints d'un lymphome de grade III au moment du diagnostic reçoivent une chimiothérapie de type EPOCH (Etoposide, prednisone, vincristine, cyclophosphamide et doxorubicine) (Tagliavini et al., 2013).

II.1.B.2. Chez les hôtes présentant des déficits immunitaires

II.1.B.2.a. Déficiences Primaires

Les maladies liées à l'immunodéficience primaire, ou d'origine génétique, constituent un groupe hétérogène de troubles immunologiques héréditaires qui augmentent la susceptibilité aux infections et aux cancers (Shabani et al., 2016, revue). Parmi les agents pathogènes impliqués, l'EBV demeure une menace majeure en raison de sa forte prévalence d'infection chez la population adulte et de l'importance du contrôle immunitaire dans la répression des syndromes lymphoprolifératifs. Les immunodéficiences primaires peuvent être de différents mécanismes et affecter plusieurs types cellulaires. Le paragraphe suivant tache de faire l'état de ces déficiences et des voies de signalisation affectées, aboutissant à une diminution de l'immunité anti-EBV.

II.1.B.2.a.1. Défauts héréditaires de cytotoxicité des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK

Les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques et les cellules NK sont essentiels pour l'élimination des cellules B infectées par l'EBV. Ces cellules exercent leurs fonctions cytotoxiques par différentes voies, la voie perforine-dépendante étant majoritaire (Parvaneh et al., 2013, revue). La voie dépendante de la perforine implique la sécrétion de granules cytotoxiques contenant de la perforine et des granzymes. La perforine dirige les granzymes dans la cellule-cible, déclenchant la mort de celle-ci (de Saint Basile et al., 2010). Les défauts de la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ et des cellules NK médiés par la voie perforine-dépendante conduisent à une réponse immunitaire incontrôlée et inefficace, entraînant une lymphohistiocytose hémophagocytaire (LHH) (Ménasché et al., 2005). Lykens et al ont montré que la cytotoxicité des cellules T et NK dépendante de la perforine régule l'activation des lymphocytes T en modulant la présentation des antigènes (Lykens et al., 2011). La LHH est souvent déclenchée par une infection virale, principalement par les

herpèsvirus. L'EBV est la cause la plus fréquente de ce syndrome (Maakaroun et al., 2010). Bien que l'EBV ait un tropisme particulier pour les lymphocytes B, l'invasion du virus au sein des lymphocytes T CD8+ joue un rôle important dans la pathogenèse de la LHH (Kasahara and Yachie, 2002, revue). Une cytotoxicité anormale des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK empêche l'élimination efficace des cellules infectées par l'EBV, conduisant à une stimulation antigénique continue des cellules T cytotoxiques et des cellules NK (Schneider et al., 2002). La survie globale des patients atteints d'une LHH liée à une immunodéficience primaire non traitée est médiocre. Les traitements pour cette pathologie sont la chimiothérapie ou des traitements immunosuppresseurs, visant à contrôler l'état inflammatoire chez les patients. Le traitement définitif consiste en la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) (Ouachée-Chardin et al., 2006; Marsh et al., 2011; Nikiforow, 2015).

Les défauts génétiques des fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK peuvent être divisés en deux groupes : les LHH familiales (LHF) et les syndromes de LHH associés à l'albinisme (**Tableau 4**).

Maladie génétique	Mode de transmission héréditaire	Gène impliqué	Protéine	LHH	Activation chronique de l'EBV	Lymphome	Albinisme
LHF2	AR	<i>PRF1</i>	Perforine	+	+/-	+	-
LHF3	AR	<i>UNC13D</i>	UNC13D	+	-	-	-
LHF4	AR	<i>STX11</i>	Syntaxin-11	+	-	-	-
LHF5	AR	<i>STXBP2</i>	Syntaxin-binding protein 2	+	+	+	-
Syndrome de Chediak-Higashi	AR	<i>LYST</i>	Lysosomal-trafficking regulator	+	-	-	+
Syndrome de Griscelli de type 2	AR	<i>RAB27A</i>	Ras-related protein Rab-27A	+	-	-	+
Syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 2	AR	<i>AP3B1</i>	AP-3 complex subunit beta-1	+/-	-	-	+

Tableau 4 : Troubles génétiques de la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+ et des cellules NK associés à la lymphohistiocytose hémato-phagocytaire.

AR : Autosomal Récessif ; EBV : Epstein-Barr Virus ; LHF : Lymphohistiocytose Hémato-phagocytaire Familiale ; LHH : Lymphohistiocytose Hémato-phagocytaire ; + : présent ; +/- : peu fréquent ; - : non reporté. Modifié d'après (Parvaneh et al., 2013).

Les mutations dans les gènes *PRF1*, *UNC13D* (*Munc13-4*), *STX11* et *STXBP2* (*Munc18-2*) sont à l'origine des LHF2, 3, 4 et 5, respectivement (Stepp et al., 1999; Feldmann et al., 2003; zur Stadt et al., 2005, 2009; Côte et al., 2009). Chaudhry et al ont montré que des mutations dans le gène de la perforine *PRF1* peut contribuer à une prédisposition héréditaire au cancer (Chaudhry et al., 2016). Ferrari et ses collaborateurs ont découvert que les mutations dans les gènes *UNC13D*, *STX11* et *STXBP2* sont suffisantes pour provoquer des défauts de sécrétion plaquettaire, entraînant une augmentation des saignements (Fager Ferrari et al., 2017).

Trois autres prédispositions génétiques peuvent conduire à l'apparition de LHH. Ces troubles génétiques sont liés à une dépigmentation de la peau et/ou une dysfonction des plaquettes et résultent d'un trafic anormal de granules dans différents types cellulaires.

Le syndrome de Chediak-Higashi est causé par des mutations dans le gène *LYST* (Barbosa et al., 1996). En plus de la LHH, cette pathologie est caractérisée par des degrés variables d'albinisme, des prédispositions aux saignements, des infections bactériennes récurrentes et un dysfonctionnement neurologique progressif (Introne et al., 1999).

Le syndrome de Griscelli de type 2 est caractérisé par une dépigmentation et l'apparition de LHH (Griscelli et al., 1978). Cette maladie est causée par une mutation dans le gène *RAB27A*, codant pour une petite GTPase impliquée dans les phases terminales de l'exocytose des granules cytotoxiques et des mélanosomes (Ménasché et al., 2000; Mamishi et al., 2008; Ohbayashi et al., 2010; Krzewski and Cullinane, 2013).

Le syndrome d'Hermansky-Pudlak de type 2 est défini par un albinisme partiel, une tendance aux saignements, une susceptibilité accrue aux infections suite à une neutropénie congénitale sévère (taux de polynucléaires bas) et une activité cytotoxique altérée (Badolato and Parolini, 2007, revue; de Boer et al., 2017). Ce syndrome est la résultante de mutations dans le gène *AP3B1*, codant pour la chaîne β du complexe de la protéine adaptatrice 3 (AP3), entraînant la dissociation du complexe protéique (Dell'Angelica et al., 1997). Les patients atteints par ce syndrome développent rarement une LHH (Jessen et al., 2013). Ces défauts génétiques empêchent la maturation d'une réponse immunitaire efficace visant à contrôler l'infection aiguë de l'EBV, en augmentant la réponse inflammatoire causée par la LHH. L'activation chronique de l'EBV (Katano et al., 2004; Rudd et al., 2006; Pagel et al., 2012; Worth et al., 2016, revue) et le développement de tumeurs lymphoïdes malignes (Clementi et al., 2005; Cannella et al., 2007; El Abed et al., 2011) ont été reportés pour certains cas de

lymphohistiocytose hémaphagocytaire familiale. Grâce à un modèle murin, Imadome et ses collaborateurs ont montré que les cellules T CD4+ jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération des cellules T CD8+ et NK infectées par l'EBV lors de la LHH associée au virus (Imadome et al., 2011). Ces résultats pourraient expliquer pourquoi les patients atteints de LHH ne développent pas systématiquement de lymphoproliférations liées à l'EBV, la prolifération des cellules infectées étant sous le contrôle des cellules T CD4+ dirigées contre le virus.

II.1.B.2.a.2. Défauts héréditaires de la signalisation des lymphocytes T et de l'interaction entre cellules B et T

Ce groupe comprend des pathologies résultant d'un défaut des cellules T dont la fonction cytotoxique est préservée mais qui présentent des aberrations génétiques dans leur signalisation intracellulaire et/ou dans l'interaction des cellules B/T. Les patients porteurs de ces déficits présentent des complications suite à l'infection par l'EBV : LHH, activation chronique de l'EBV ou lymphomes associés à l'EBV (**Tableau 5**).

Type de déficience	Mode de transmission héréditaire	Gène impliqué	Protéine	L H H	Activation chronique de l'EBV	Lymphome	Nombre de cellules iNKT
Déficience en SAP	XL	<i>SH2D1A</i>	SH2 domain-containing protein 1A	+	-	+	□
Déficience en XIAP	XL	<i>XIAP</i>	E3 ubiquitin-protein ligase XIAP	+	-	-	N/□
Déficience en ITK	AR	<i>ITK</i>	Tyrosine-protein kinase ITK/TSK	+	+	+	□
Déficience en CD27	AR	<i>CD27</i>	CD27	+	+	+	N/□
Déficience en MAGT1	XL	<i>MAGT1</i>	Magnesium transporter protein 1	-	+	+	N
Déficience en STK4	AR	<i>STK4</i>	Serine/threonine-protein kinase 4	-	+	+	?
Déficience en Coronine-1A	AR	<i>CORO1A</i>	Coronine-1A	-	+	+	□
CAEBV	?	?		+	+	+	?

Tableau 5 : Principales déficiences en lymphocytes T entraînant des pathologies associées à l'EBV.

AR : Autosomal Récessif ; CAEBV : infection chronique active de l'EBV ; EBV : Epstein-Barr Virus ; iNKT : NK/T invariant ; ITK : interleukin-2 inducible T cell kinase ; LHH : Lymphohistiocytose Hématophagocytaire ; MAGT1 : transporteur de magnésium 1 ; SAP : SLAM (signalling lymphocyte activation molecule) associated protein ; STK4 : serine/threonine protein kinase 4 ; XIAP : Protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X ; + : présent ; +/- : peu fréquent ; - : non reporté ; ? : non étudié ou non défini ; N : normal. Modifié d'après (Parvaneh et al., 2013).

Déficience en SAP

Le syndrome lymphoprolifératif lié à l'X (XLP), ou syndrome de Purtilo, représente une des immunodéficiences primaires la plus représentée, conduisant à une susceptibilité particulière à l'infection par l'EBV (Purtilo et al., 1975). Cette pathologie est causée par une mutation dans le gène *SH2D1A*, codant pour la protéine Signalling Lymphocyte Activation Molecule (SLAM)-Associated Protein (SAP) (Coffey et al., 1998; Nichols et al., 1998; Sayos et al., 1998). La famille des SLAM (SLAMF) est composée de neuf protéines transmembranaires (SLAMF1-9), exprimées à la surface de la plupart des cellules

hématopoïétiques. La majorité des récepteurs SLAMF constituent des auto-ligands (Detre et al., 2010, revue). Les récepteurs SLAMF sont des molécules costimulatrices à la surface des lymphocytes T CD4+ et CD8+ et des cellules NK. Ils régulent le développement et la fonction des lymphocytes T et modulent l'activité lytique, la production de cytokines et l'inhibition cellules NK indépendamment du complexe majeur d'histocompatibilité (Detre et al., 2010, revue). La protéine SAP est une molécule adaptatrice exprimée par les cellules du système immunitaire. Elle est composée quasi exclusivement d'un domaine Src homology 2 (SH2). Grâce à son domaine SH2, SAP s'associe avec des tyrosines au niveau du domaine cytoplasmique des récepteurs de la famille des SLAM des cellules immunitaire et est nécessaire pour la fonction de ces récepteurs. Selon Latour et *al*, cette propriété résulte de la capacité de SAP à recruter spécifiquement et à activer FynT, une tyrosine kinase cytoplasmique associée à Src (Latour et al., 2003). Les auteurs démontrent que SAP se lie au domaine SH3 de FynT *via* une autre région du domaine SH2 de SAP. Cette interaction est essentielle pour la signalisation des cellules T dépendante de SAP et pour la capacité de SAP à moduler la fonction des cellules immunitaires (Latour et al., 2003). Ces travaux ont été confirmés par l'équipe de Chan (Chan et al., 2003).

La protéine SAP peut également moduler la signalisation de SLAM par blocage compétitif de la liaison à d'autres protéines interagissant avec le récepteur SLAM (Sayos et al., 1998; Lewis et al., 2001). Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques déficients en SAP ne sont pas capables de détruire les cellules B cibles dont celles infectées par l'EBV, alors qu'ils sont en mesure d'éliminer d'autres cellules présentatrices d'antigènes (Hislop et al., 2010, 2010; Palendira et al., 2011). Selon Menard et *al*, les patients atteints de XLP présentent un défaut dans la tolérance aux cellules B périphériques, normalement contrôlée par les lymphocytes T régulateurs (Tregs). Les auteurs ont montré que les Tregs issus des patients XLP sont fonctionnels, mais que les lymphocytes T déficients en SAP sont résistants à l'immunosuppression médiée par les Tregs. Ces résultats suggèrent que la voie de signalisation SLAM/SAP joue un rôle essentiel dans la tolérance immunitaire B (Menard et al., 2014).

Les patients présentant des déficiences en SAP sont atteints de mononucléose infectieuse ou de LHH fulminantes. Ils sont caractérisés par une hypogammaglobulinémie (baisse des gammaglobulines, impliquées dans la régulation du système immunitaire), et le développement de syndromes lymphoprolifératifs (Booth et al., 2011; Pachlopnik Schmid et al., 2011). Les patients peuvent développer les symptômes de la pathologie en l'absence

d'infection par le virus. Lorsque le tableau complet des symptômes cliniques est établi, les patients atteints de XLP ont un pronostic de survie très faible (Booth et al., 2011).

Déficiences en XIAP

Le gène *X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP)* code pour la protéine inhibitrice de l'apoptose liée au chromosome X (XIAP), autrement appelée inhibitor of apoptosis protein 3 (IAP3) ou baculoviral IAP repeat-containing protein 4 (BIRC4). Il s'agit d'une molécule anti-apoptotique appartenant à l'IAP étant composée de trois domaines de baculovirus IAP repeat (BIR) et d'un nouveau gène intéressant (RING : Really Interesting New Gene) en C-terminal, avec une activité E3 ubiquitine ligase (Latour, 2007). Ce gène est exprimé de manière ubiquitaire et inhibe l'apoptose *via* son interaction directe avec les caspases, par l'intermédiaire de son domaine BIR (Hinds et al., 1999). *XIAP* est également impliqué dans l'activation de plusieurs voies de signalisation, telles que Notch, la voie JNK et NF- κ B, les principales voies de signalisation détournées par l'EBV (Vaux and Silke, 2005; Galbán and Duckett, 2010). Les patients présentant un déficit en *XIAP* étaient initialement caractérisés par un phénotype XLP (Rigaud et al., 2006). Par la suite, ces résultats ont été controversés. L'équipe de Marsh et *al* a notamment montré que les patients atteints d'un déficit en *XIAP* présentent des homologues phénotypiques avec les patients atteints de lymphohistiocytose hémaphagocytaire familiale (Marsh et al., 2010). Ces résultats ont été discutés trois années plus tard, décrivant une hétérogénéité des patients atteints par cette mutation, comprenant des phénotypes de la maladie de Crohn (Speckmann et al., 2013). Aguilar et Latour ont établi un consensus en 2015 à propos de cette maladie, pouvant être caractérisée par une susceptibilité élevée à la LHH, souvent en réponse à une infection par l'EBV, une splénomégalie récurrente, et une maladie inflammatoire de l'intestin (MII) présentant les caractéristiques de la maladie de Crohn (Aguilar and Latour, 2015). Marsh et *al* ont montré que la transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques dans le cadre d'une déficience en *XIAP* conduit à une survie globale médiocre des patients (Marsh et al., 2013).

Déficiences en *ITK*

Le gène *interleukin-2-inducible T-cell kinase (ITK)* code pour une tyrosine kinase non réceptrice exprimée par les lymphocytes T, décrite à l'origine comme une molécule importante dans la voie de signalisation du TCR (Gomez-Rodriguez et al., 2009; Grasis et al., 2010). Dans les lymphocytes T, *ITK* module la signalisation du complexe TCR et affecte la signalisation d'activation par la nécessité d'une induction de TCR normal par et une mobilisation consécutive de calcium (Readinger et al., 2009). *ITK* fournit des signaux essentiels à la maturation terminale, à la survie et à la production de cytokines des cellules iNKT (Felices and Berg, 2008).

Les patients déficients en *ITK* présentent une lymphoprolifération massive de cellules B EBV-positives, pouvant progresser en lymphome hodgkinien malin dans certains cas (Huck et al., 2009; Stepensky et al., 2011; Linka et al., 2012; Mansouri et al., 2012). Les caractéristiques immunologiques communes aux patients présentant un déficit en *ITK* sont une hypogammaglobulinémie progressive et une diminution progressive des cellules T CD4+, associées à une diminution du nombre de cellules iNKT. Serwas et al ont montré qu'une déficience en *ITK* pourrait être une cause génétique de la lymphopénie des cellules T CD4+ idiopathique (nombre de LT CD4+ inférieur à 300/ μ L) (Serwas et al., 2014).

Déficiences en *CD27*

L'expression du gène *CD27* est utilisée comme un marqueur des cellules B mémoires. Les patients atteints d'une déficience en *CD27* présentent une immunodéficiences des lymphocytes B (Wehr et al., 2008). *CD27* est également exprimé à la surface d'un sous-ensemble de lymphocytes T matures (Hintzen et al., 1993). Après s'être lié à son ligand naturel *CD70*, *CD27* régule la différenciation et l'activation dans des sous-groupes de cellules B, T et NK (Borst et al., 2005; Nolte et al., 2009). La signalisation du *CD27* est importante pour générer la mémoire des lymphocytes T cytotoxique spécifique de l'EBV et pour induire la cytotoxicité des cellules NK (Yang et al., 1996; Yamada et al., 2002; van Gisbergen et al., 2011). Van Montfrans et ses collaborateurs ont montré que la déficience en *CD27* chez les patients peut expliquer certains cas de chronicité d'activation de l'EBV, associée à une hypogammaglobulinémie et la génération de lymphocytes T déficients (van Montfrans et al., 2012). Ces résultats ont été confirmés par Salzer et suggèrent qu'une déficience en *CD27*

prédispose les patients à une immunodéficience combinée B/T, associée à une lymphohistiocytose hémaphagocytaire, à une lymphoprolifération, et à l'émergence de lymphomes associés à l'EBV (Salzer et al., 2013). Selon Alkhairy et al., la déficience en *CD27* devrait être recherchée dans toutes les lymphoproliférations graves liées à l'EBV. Pour cela, les auteurs ont mis au point un test rapide et fiable en cytométrie en flux pour vérifier si les patients ont une déficience en ce gène (Alkhairy et al., 2015).

Déficience en *MAGT1*

Un afflux rapide de magnésium (Mg^{2+}) est induit par la stimulation du TCR dans les cellules T normales (Li et al., 2011). Une déficience en *MAGT1* dans les cellules T abroge l'afflux de Mg^{2+} . Cette déficience conduit à une réponse altérée de l'engagement du TCR, comprenant une activation défectueuse de la phospholipase $C\gamma 1$ et un afflux de Ca^{2+} spécifiquement dans les lymphocytes T (Li et al., 2011). Malgré que les cellules B expriment *MAGT1*, la stimulation du BCR n'induit pas un flux de Mg^{2+} (Ravell et al., 2014, revue). La déficience en *MAGT1* conduit à l'émergence de la pathologie nommée «XMEN» pour «X-linked immunodeficiency with magnesium defect, EBV infection, and neoplasia» (Li et al., 2014). Cette maladie est caractérisée par une activation chronique de l'EBV associée à un nombre élevé de cellules B infectées par le virus, et une susceptibilité accrue à développer des lymphomes associés à l'EBV (Li et al., 2014). Les patients atteints de la maladie XMEN ont une activation altérée des lymphocytes T, une diminution de l'activité cytotoxique des lymphocytes T cytotoxiques et des cellules NK, due à l'expression réduite du récepteur des cellules NK, NGK2D (Ravell et al., 2014, revue).

Déficience en *STK4*

La sérine-thréonine kinase (*STK4*), autrement appelé *MST1*, a été initialement identifiée comme une kinase exprimée de manière ubiquitaire, possédant une homologie structurale avec la levure Ste20 (Creasy and Chernoff, 1995). *STK4* est nécessaire pour l'activation de la protéine forkhead box protein O1 (FOXO1) et FOXO3, des facteurs de transcription essentiels à l'homéostasie des lymphocytes T et à l'induction d'une réponse efficace des lymphocytes T cytotoxiques lors des infections virales chroniques, dont l'EBV (Kerdiles et al., 2009; Ouyang et al., 2009; Abdollahpour et al., 2012; Sullivan et al., 2012).

Plusieurs auteurs ont identifié que le gène *STK4/MST1* joue un rôle essentiel dans la régulation et la fonction des lymphocytes T (Abdollahpour et al., 2012; Crequer et al., 2012; Nehme et al., 2012). Les patients étant mutés pour le gène *STK4* présentent une susceptibilité aux infections par divers microorganismes, peuvent développer des lymphoproliférations, une auto-immunité, un état inflammatoire ou/et allergique. Des tumeurs malignes peuvent également émerger (Halacli et al., 2015).

Déficience en *CORO1A*

La coronine-1A est exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques. Elle joue un rôle clé dans la signalisation du TCR et dans l'homéostasie des lymphocytes T (Mugnier et al., 2008; Mueller et al., 2011; Siegmund et al., 2016). Des mutations dans le gène *CORO1A* ont été reportées chez un patient présentant une immunodéficiência combinée T/B caractérisée par une lymphopénie T et une prédisposition particulière aux infections bactériennes et virales (Shiow et al., 2008). Moshous et al ont étudié trois cas provenant d'une famille consanguine, présentant une lymphopénie sévère en rapport avec un déficit des lymphocytes T naïfs (Moshous et al., 2013). Les auteurs ont découvert que les patients présentaient une diminution de la diversité du répertoire T, une quasi-absence des cellules iNKT, et un nombre fortement diminué de cellules T associés aux muqueuses. Ces résultats suggèrent que des mutations dans le gène *CORO1A* induisent une susceptibilité accrue des patients à développer des lymphoproliférations liées à l'EBV (Moshous et al., 2013). A ce jour, sept patients présentant des mutations dans le gène *CORO1A* ont été reportés. Punwani et ses collaborateurs en ont fait une description précise (Punwani et al., 2015).

La **Figure 23** représente la dérégulation des gènes impliqués dans la voie de signalisation du récepteur des lymphocytes T (TCR) ainsi que les facteurs de co-stimulation qui y sont associés, conduisant à une susceptibilité à l'EBV.

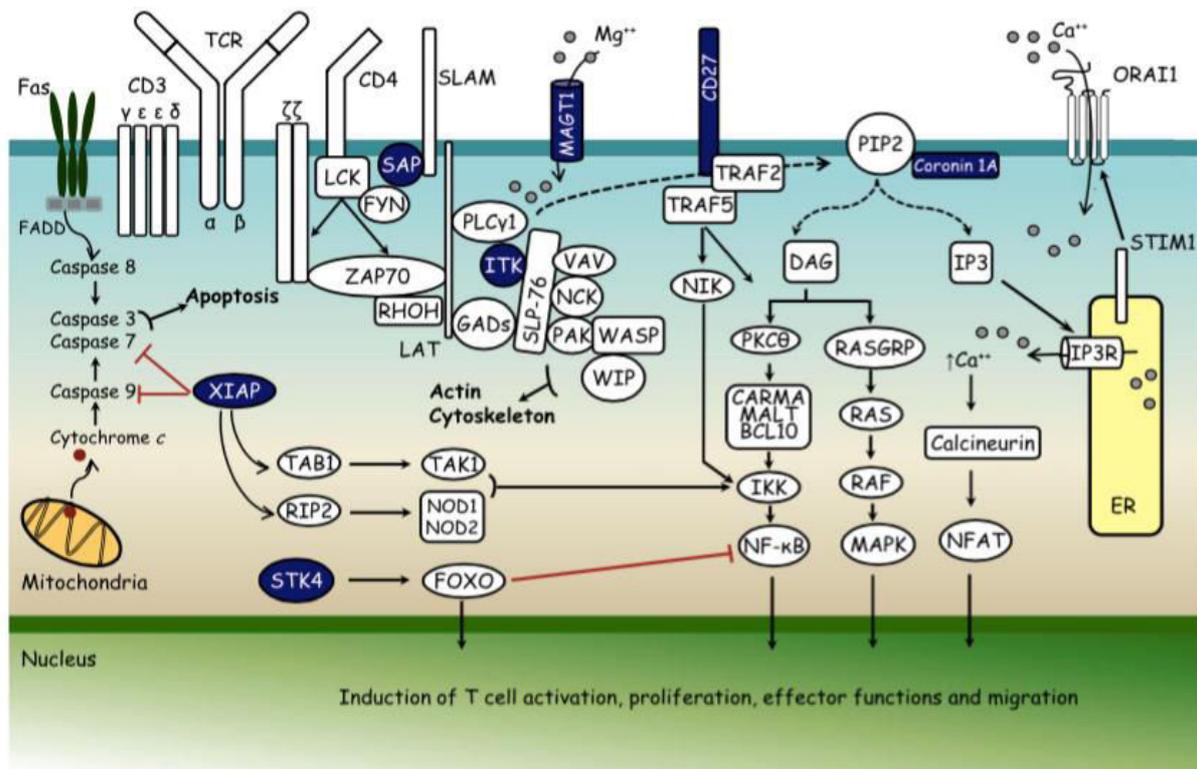


Figure 23 : Mutation des gènes impliqués dans la voie de signalisation du TCR conduisant à une susceptibilité à l'EBV.

Voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération, la différenciation, l'homéostasie et la migration des cellules T. Les gènes mutants chez les patients présentant une sensibilité à l'EBV sont indiqués en bleu. BCL10 : B-cell lymphoma/leukaemia 10; CARMA : CARD-containing MAGUK protein; DAG : diacylglycerol; ER : endoplasmic reticulum; FADD: Fas-associated protein with death domain; IKK : IκB kinase; IP3 : inositol trisphosphate; IP3R : inositol trisphosphate receptor; LCK: lymphocyte-specific protein tyrosine kinase; MALT : mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein; MAPK : mitogen-activated protein kinase; NCK : non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein; NFAT : nuclear factor of activated T cells; NIK : nuclear factor (NF)-κB-inducing kinase; PIP2 : phosphatidyl inositol bisphosphate; RASGRP : RAS guanyl nucleotide–releasing protein; RHOH : Ras homolog gene family member H; RIP2 : receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 2; SAP : SLAM (signalling lymphocyte activation molecule)-associated protein ; XIAP : X-linked inhibitor of apoptosis protein; ITK : interleukin-2 inducible T cell kinase; MAGT1 : magnesium transporter 1; STK4 : serine/threonine protein kinase 4; SLP-76 : SH2 domain–containing leucocyte protein of 76 kDa; STIM1 : stromal interaction molecule 1; TAB 1 : TAK1-binding protein; TRAF : TNF receptor associated factor; WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein; WIP : WASP-interacting protein; ZAP70 : z-chain associated protein kinase of 70 kDa. D'après (Parvaneh et al., 2013).

L'infection chronique active de l'EBV

L'infection chronique active de l'EBV (CAEBV : Chronic Active EBV disease) est une pathologie mortelle principalement recensée au Japon. Les patients présentent des niveaux élevés d'ADN de l'EBV dans le sang, de la fièvre, une splénomégalie, une lymphadénopathie (inflammation des ganglions lymphatiques), un dysfonctionnement

hépatique et une pancytémie (réduction du nombre de globules rouges, blancs et du nombre de plaquettes) (Kimura et al., 2001). La maladie active chronique de l'EBV peut être de plusieurs origines cellulaires et est classifiée en CAEBV de type B, T ou cellules NK. Les patients atteints de CAEBV des lymphocytes T ont une survie globale plus courte que ceux atteints d'une maladie de type NK (Kimura et al., 2001; Cohen et al., 2009). Environ un tiers des patients développent une LHH associée à l'EBV, et ils présentent une dysmagaglobulinémie (Kimura et al., 2003; Sugaya et al., 2004; Cohen et al., 2011). La plupart des patients ont un pronostic de survie médiocre. Les traitements antiviraux sont dans la plupart des cas inefficaces. Quant aux traitements chimiothérapeutiques et immunosuppresseurs, ils ne permettent pas de guérir la maladie. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques demeure la meilleure solution thérapeutique, et devrait être effectuée dès l'apparition de la pathologie (Sato et al., 2008; Cohen et al., 2011; Kawa et al., 2011; Shannon-Lowe et al., 2017). A ce jour, la cause génétique de l'infection chronique active de l'EBV n'a pas été identifiée.

D'autres cas de déficits immunitaires primaires provoquant une susceptibilité de développer des maladies associées à l'EBV ont été reportés. Shabani et ses collaborateurs ont établi un consensus sur la caractérisation de l'ensemble de ces patients en 2016 (Shabani et al., 2016).

En synthèse, les déficiences immunitaires primaires conduisent à une diminution du contrôle des cellules infectées par l'EBV par les acteurs du système immunitaire. Les mutations survenant dans certains gènes identifiés conduisent à une susceptibilité des patients à développer des pathologies dont le pronostic vital est médiocre. La transplantation de cellules souches hématopoïétiques est le traitement définitif dans certains cas, permettant une meilleure survie globale des patients (hormis pour la déficience en *XIAP*). Le développement de thérapies géniques est une avancée prometteuse pour les pathologies résultant d'une déficience primaire dont le gène a été identifié (Fischer et al., 2015, revue).

II.1.B.2.b. Déficiences acquises

Les lymphomes associés à l'EBV sont bien caractérisés chez les patients présentant des déficits acquis du système immunitaire, comme c'est le cas après une transplantation ou chez des personnes atteintes par le Virus de l'Immunodéficiência Humaine (VIH)/ Syndrome

d'Immunodéficience Acquise (SIDA). Le **Tableau 6** présente les différents types de lymphomes développés par les patients immunodéprimés. Par la suite, un paragraphe sera dédié aux désordres lymphoprolifératifs post-transplantation, et un second fera l'objet de l'émergence des principaux lymphomes retrouvés chez les patients atteints du SIDA.

Type de lymphome	Fréquence de l'EBV	Programme de latence
Lymphome de Burkitt (SIDA)	25-35%	I
Lymphome primitif des séreuses (LPS)	>80%	I
Lymphome plasmablastique (SIDA)	100%	I
Lymphome plasmablastique (LP)	≈70%	I ou II
Lymphome de Hodgkin (SIDA)	>80%	II
Lymphome primaire du système nerveux central (SIDA)	100%	III
Désordre lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD), cellules B	>90%	III
Désordre lymphoprolifératif post-transplantation (PTLD), cellules NK/T	>70%	III
Lymphome non Hodgkinien (LNH) avec désordres immunitaires acquis	>90%	III
Lymphome d'immunodéficience iatrogène	40-50%	III

Tableau 6 : Lymphomes associés à l'EBV chez les sujets immunodéprimés.

Modifié d'après (Roschewski, 2012, revue).

II.1.B.3.b.1. Syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation

Les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLDs, Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders) constituent un groupe hétérogène de syndromes lymphoprolifératifs qui sont la conséquence d'une déficience immunitaire acquise après transplantation allogénique d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques. L'EBV est causal pour ce type de lymphoproliférations. Les PTLDs sont associés à la réactivation de l'EBV dans 60 à 70% des cas, allant de l'hyperplasie bénigne avec infiltration cellulaire polymorphe, aux lymphomes agressifs mortels. Des proliférations polyclonales, oligoclonales et monoclonales peuvent être observées chez les patients atteints de PTLD (LaCasce, 2006, revue). Au niveau morphologique, les PTLDs sont divisés en variants monomorphes, polymorphes, plasmocytaires ou de type lymphome de Hodgkin. Ils sont

principalement issus des lymphocytes B, mais les lymphocytes T et les cellules NK peuvent également être à l'origine de ces lymphomes (Draoua et al., 2004). Les cellules issues des lymphomes B sont en programme de latence III de l'EBV, et expriment l'ensemble des protéines de latence virale. Ces cellules s'apparentent aux LCLs obtenues *in vitro*.

De nombreuses études ont corrélé la charge virale de l'EBV avec le risque de développer une PTLD chez les patients. L'étude de la charge virale dans le sang des patients est actuellement employée en routine afin d'évaluer le risque qu'une PTLD émerge, et établir le pronostic vital des patients (Dharnidharka, 2017, revue). Etant donné l'étroite corrélation entre les PTLDs et l'EBV, il paraît essentiel pour la prévention de ces maladies de tester systématiquement si le génome de l'EBV est présent dans le sang périphérique des patients (Dharnidharka, 2017, revue).

II.1.B.3.b.2. Lymphomes des patients atteints par le SIDA

Les lymphomes primitifs des séreuses (LPS) sont des lymphomes à grandes cellules B qui surviennent habituellement dans le cadre d'une immunodéficience telle que le SIDA. Ils sont toujours associés au HHV-8, autrement appelé herpès virus lié au sarcome de Kaposi (HVS-K). La plupart des patients atteints de LPS sont également infectés par l'EBV, suggérant que celui-ci constitue un facteur pathogénique important (Fan et al., 2005). Ils sont associés au phénotype de latence I de l'EBV. Le rôle oncogénique exact de l'EBV n'est pas clarifié pour ces lymphomes (Gaidano et al., 2000). Il n'existe pas à ce jour de traitement efficace pour les LPS, et les patients ont un taux de survie globale médiocre, indépendamment des facteurs liés à l'âge, au sexe et au stade de la tumeur (El-Fattah, 2016).

Les lymphomes plasmablastiques (LP) constituent un groupe hétérogène de lymphomes B agressifs, qui surviennent le plus souvent dans le cadre d'une immunodéficience liée au VIH, avec des taux de lymphocytes T CD4+ très faibles. L'EBV est associé de manière variable aux lymphomes plasmablastiques. Mais 100% des cas de type oral sont EBV-positifs chez les patients atteints du SIDA. Ils sont caractérisés par un phénotype cellulaire plasmatique, et une morphologie immunoblastique (Colomo et al., 2004). Le rôle exact de l'EBV dans l'émergence de ces lymphomes n'est pas encore déterminé, les deux oncoprotéines majeures LMP1 et EBNA2 étant rarement exprimées (programme de type I). Les réarrangements de *MYC* sont retrouvés chez plus de 50% des patients atteints de LP, et

plus fréquemment rencontrés chez les sujets EBV-positifs, suggérant un mécanisme possible de la lymphomagénèse associée à l'EBV (Valera et al., 2010). A ce jour, les lymphomes plasmatiques tendent à être diagnostiqués tardivement, ce qui conduit à une survie globale médiocre chez les patients (Tchernonog et al., 2016).

Les lymphomes de Hodgkin associés au VIH (LH-VIH) ont une incidence plus élevée chez les patients atteints d'une immunodéficience acquise que chez le reste de la population (Mounier et al., 2010). Les cellules de Reed-Stenberg, caractéristiques des lymphomes de Hodgkin, sont retrouvées plus fréquemment chez les patients atteints de LH-VIH, par comparaison aux patients non atteints par le SIDA. Les épisomes d'EBV clonaux sont retrouvés dans 80 à 100% des cas. Les LH-VIH possèdent un phénotype de programme de latence II de l'EBV. La protéine oncogène LMP1 est pratiquement toujours exprimée, contrairement au ligand de CD40. La surexpression de LMP1 conduit à l'activation, la croissance et la survie des cellules infectées par l'EBV, contribuant ainsi à la plupart des caractéristiques du lymphome Hodgkinien lié au VIH (Dolcetti et al., 2001).

Les lymphomes primitifs du système nerveux central (LPSNC) sont un sous-type de lymphome très agressifs, localisés au niveau des espaces intracérébraux ou intraoculaires chez les patients atteints du SIDA. Au niveau morphologique, ces types de lymphomes sont comparables DLBCLs, présentant un aspect immunoblastique et associés à un déficit immunitaire profond. Dans 100% des cas, les lymphomes primaires du système nerveux central sont liés à l'EBV en programme de latence III, et sont corrélés à la surexpression de LMP1 et BCL-2 (Camilleri-Broët et al., 1995). Les LPSNC liés au virus du SIDA tendent à être plus diffus que chez les hôtes immunocompétents EBV positifs, et interviennent chez des sujets plus jeunes (Bayraktar et al., 2011).

II.2. Facteurs cellulaires favorisant l'émergence et le développement des tumeurs

II.2.A. Via les exosomes

Les exosomes sont des vésicules extracellulaires qui sont libérées des cellules lors de la fusion entre un compartiment endocyttaire intermédiaire, le corps multvésiculaire, et la membrane plasmique (Edgar, 2016, revue). Cela conduit à la libération des vésicules

intraluminales dans le milieu extracellulaire. Ces vésicules libérées sont nommées exosomes. Il est suggéré que les exosomes jouent un rôle essentiel dans la communication intercellulaire et la transmission de macromolécules entre cellules. Ces vésicules permettent également la propagation de protéines, de lipides, d'ARNm, de micro-ARNs et d'ADN, et contribuent au développement de plusieurs pathologies. Enfin, les exosomes peuvent servir de vecteur pour les médicaments, car ils sont composés de membranes cellulaires plutôt que de polymères synthétiques, et sont mieux tolérés par l'organisme humain (Edgar, 2016, revue).

Nanbo et son équipe ont étudié le mode d'internalisation d'exosomes dérivés de cellules épithéliales EBV-négatives, ou infectées en programme de latence I ou III de l'EBV. Il en résulte que les exosomes dérivés des trois types cellulaires sont internalisés de la même manière dans les cellules épithéliales cibles (Nanbo et al., 2013). L'internalisation des exosomes est significativement diminuée suite au traitement avec un inhibiteur de la dynamine et par la sous-expression de la cavéoline-1. Les exosomes issus des cellules en latence III de l'EBV induisent une augmentation de la prolifération et l'expression de la Molécule d'Adhésion Intercellulaire-1 (ICAM-1) des cellules réceptrices, et cela de manière plus significative que pour les exosomes produits par les lignées cellulaires non infectées ou infectées en latence de type I. La libération d'exosomes par les cellules B infectées est un processus dépendant de la dynamine et de la cavéoline, et contribue à des changements phénotypiques des cellules réceptrices, *via* le transfert d'un ou plusieurs éléments viraux (Nanbo et al., 2013).

Ahmed et ses collaborateurs ont montré que les deux sous-types d'ARNs non-codants de l'EBV, EBER-1 et -2, sont présents dans les fractions purifiées exosomales de toutes les lignées cellulaires infectées par l'EBV de l'étude, en comparaison avec des lignées non transformées par le virus. De plus, ils ont découvert que les fractions des exosomes purifiées contiennent également la protéine La, ayant pour fonction la liaison aux EBERs. Ces résultats montrent que les EBERs sont probablement libérés des cellules infectées par l'EBV sous forme de complexes EBER-La dans les particules exosomales. Ces résultats suggèrent qu'il peut s'agir d'un des mécanismes de l'EBV pour détourner le système immunitaire de l'hôte (Ahmed et al., 2014).

Gallo et ses collaborateurs ont étudié le profil global des ARNs non-codants viraux et cellulaires dans les lignées lymphoblastoïdes induites par l'EBV. Les auteurs ont identifié que

tous les micro-ARNs viraux exprimés dans les LCLs sont empaquetés dans les exosomes. De manière plus particulière, les auteurs ont constaté que deux micro-ARNs, ebv-miR-BART3 et ebv-miR-BHRF1, sont plus abondants dans les particules exosomales, ce qui suggère un transfert des micro-ARNs viraux par microvésicules (Gallo et al., 2017).

Selon Aga et *al*, le facteur induit par l'hypoxie HIF1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α) endogène est détectable dans les exosomes, et que l'oncoprotéine LMP1 augmente de manière significative les niveaux de HIF1 α dans ces derniers. L'analyse immunohistochimique des tissus tumoraux issus de carcinomes nasopharyngés révèle une corrélation directe entre les niveaux d'expression de LMP1 et de CD63, un des marqueurs des exosomes, suggérant une augmentation de la formation des exosomes dans cette tumeur maligne liée à l'EBV. Les auteurs émettent l'hypothèse que le transfert de facteurs pro-métastatiques fonctionnels médié par les exosomes de cellules issues de NPC LMP1-positives à des cellules tumorales environnantes favorise la progression du cancer (Aga et al., 2014).

Une autre étude menée par l'équipe de Ahmed montre que les exosomes issus des lymphocytes B infectés par l'EBV conduisent à l'apoptose de différents sous-types cellulaires, comprenant les lymphocytes B, T et les cellules épithéliales. Ils ont pu démontrer que les exosomes issus des cellules immortalisées par le virus déclenchent la mort par apoptose *via* une voie extinsèque, médiée par FasL. Ainsi, les anticorps anti-FasL pourraient bloquer l'apoptose médiée par voie exosomale. Cette étude apporte des données complémentaires indiquant comment l'EBV parvient à détourner la voie exosomale pour excréter des composants viraux et cellulaires qui peuvent moduler son microenvironnement (Ahmed et al., 2015).

Ces données révèlent de nouveaux mécanismes sur la façon dont l'EBV peut manipuler le microenvironnement cellulaire, à travers le transfert exosomal des facteurs viraux et cellulaires (Meckes, 2015, revue). Des fonctions de signalisation importantes des exosomes sont modifiées par LMP1 dans les cellules B infectées. Dans les cancers associés à l'EBV, ces exosomes modifiés par le virus peuvent influencer la croissance tumorale des cellules voisines, inhiber la fonction immunitaire ou stimuler l'angiogenèse (Meckes, 2015, revue.) Ils participent ainsi à l'émergence de plusieurs types de lymphomes, dont les lymphomes non Hodgkiniens.

II.2.C. Via l'IL-10

L'IL-10 peut avoir deux origines : virale (vIL-10) ou cellulaire (hIL-10). Le gène *BCRF1* codant pour l'IL-10 viral a été cloné en 1990 par Hsu et ses collaborateurs (Hsu et al., 1990). L'IL-10 viral n'est exprimé que lors du cycle lytique de l'EBV. Des clones d'ADNc codant pour l'IL-10 humain ont été isolés par Vieira et al à partir d'une cellule T CD4+ humaine dirigée spécifiquement contre la toxine tétanique (Vieira et al., 1991). L'IL-10 cellulaire est exprimée durant la phase de latence de l'EBV. L'IL-10 peut se lier à deux récepteurs : l'IL10R1 et l'IL10R2.

Cette cytokine joue un rôle central dans la limitation de la réponse immunitaire de l'hôte aux agents pathogènes et le maintien d'une homéostasie normale des tissus. La dérégulation de l'IL-10 est associée à une augmentation des pathologies immunes en réponse à une infection, ainsi qu'un risque accru de développer des maladies auto-immunes (Iyer and Cheng, 2012, revue). L'IL-10 joue également un rôle central dans l'émergence de différents types de cancers (Mannino et al., 2015, revue).

II.2.C.1. IL-10 chez les patients atteints de cancers liés à l'EBV

Beatty et al ont mené des études sur des lignées cellulaires lymphoblastoïdes spontanées (SLCL) issues de patients atteints de syndromes lymphoprolifératifs associés à l'EBV (Beatty et al., 1997). Ils ont montré que l'interleukine 10 est produite par les SLCL, et que la sécrétion de cette interleukine est corrélée avec la croissance des lignées lymphoblastoïdes. L'IL-10 est un facteur majeur pour la croissance des tumeurs liées à l'EBV, et peut jouer un rôle majeur dans le développement de troubles lymphoprolifératifs liés à l'EBV (Beatty et al., 1997).

De nombreuses études révèlent que l'IL-10 est impliqué dans les syndromes lymphoprolifératifs post-transplantation. Les transcrits de l'IL-10 ont été retrouvés dans des biopsies de tumeurs issues de patients qui étaient atteints de PTLD, ce qui suggère l'importance de cette cytokine dans la progression des lymphomes liés à l'EBV (Johannessen et al., 2002).

Birkeland et ses collaborateurs ont montré que cette cytokine peut jouer un rôle important dans la tolérance aux transplantations, en induisant une anergie durable aux alloantigènes spécifiques du donneur et de l'hôte. Cette anergie est probablement causée par une régulation négative des cytokines Th1 dans le greffon. Ces données sont informatives quant aux nouvelles stratégies de prévention et de thérapies des PTLDs ; l'anergie serait nécessaire pour l'induction de tolérance chez les patients transplantés (Birkeland et al., 1999).

Muti et *al* ont également corrélé le niveau élevé de cette interleukine chez les patients atteints de PTLD, comparé aux individus témoins. Ils suggèrent l'utilité du dosage de l'IL-10 pour le diagnostic précoce des PTLDs, dans la mesure où il est corrélé au test de quantification de la charge virale de l'EBV (Muti et al., 2003a).

Levin et ses collaborateurs ont récemment prouvé que des niveaux élevés d'IL-10, d'IL-6 et de CD30 soluble (sCD30) peuvent prédire l'apparition de lymphomes Hodgkiniens classiques (cLH). L'association de ces cytokines avec le risque de cLH peut refléter la production de ces molécules par les cellules tumorales naissantes, ou par les cellules du système immunitaire agissant contre elles, avant la détection clinique. Un environnement immunitaire stimulant les lymphocytes B précède la lymphomagenèse, et peut favoriser celle-ci (Levin et al., 2017).

Les niveaux de l'IL-10 et d'une autre molécule immunosuppressive, le TGF- β 1, sont significativement augmentés dans les sérums de patients atteints de carcinomes laryngés EBV-positifs, comparé aux individus sains (Rota et al., 2010).

Il a été montré que l'expression du micro-ARN-194 cellulaire est uniquement supprimée dans les lignées cellulaires EBV-positives provenant de patients atteints de PTLD, et que la région 3' de l'IL-10 est ciblée par le micro-ARN-194. La surexpression de ce micro-ARN atténue la production de l'IL-10 et augmente l'apoptose des lignées de lymphomes B EBV-positives. Harris-Arnold et *al* ont démontré, par des études transcriptomiques, que l'EBV coopère avec le réseau des micro-ARNs des lymphocytes B de l'hôte, et supprime spécifiquement le micro-ARN-194 pour promouvoir la production de l'IL-10. La modulation de ce miARN pourrait constituer une cible potentielle pour inhiber la prolifération des lymphomes B EBV-positifs chez les patients atteints de PTLD (Harris-Arnold et al., 2015).

II.2.C.2. IL-10 et immunosuppression

Zeidler et ses coéquipiers ont montré que l'IL-10 viral affecte l'expression de l'une des deux protéines de transport (TAP1 : Transport Antigen Protein 1), associée à la présentation antigénique. L'IL-10 humain possède la même activité. La régulation négative de TAP1 par l'IL-10 entrave le transport des antigènes peptidiques dans le réticulum endoplasmique. En conséquence, l'IL-10 entraîne une diminution générale des molécules CMHI à la surface des lymphocytes B, ce qui pourrait également affecter la reconnaissance des cellules B infectées par les lymphocytes T cytotoxiques (Zeidler et al., 1997).

BNFL2A, une protéine conservée chez tous les lymphocryptovirus (LCV), est connue pour inhiber les protéines TAP (Hislop et al., 2007a). Grâce à des mutants de l'EBV déficients en *BCRF1* et *BNFL2A*, Jochum et son équipe ont identifié que *BNFL2A* nuit à la reconnaissance des cellules B infectées par le virus par les lymphocytes CD8+ spécifiques de l'EBV au cours des premiers jours de l'infection virale. L'IL-10 virale joue un rôle de protection des lymphocytes B immortalisés vis-à-vis de l'élimination des cellules infectées par les cellules NK. L'IL-10 virale libérée des cellules nouvellement infectées empêche la sécrétion de cytokines antivirales, abrogeant ainsi les fonctions des lymphocytes T effecteurs CD4+ spécifiques de l'EBV. Selon Jochum et ses collaborateurs, *BNFL2A* et *vIL-10/BCRF1* agissent de manière complémentaire pour prévenir la reconnaissance immunitaire et l'élimination des cellules nouvellement infectées par l'EBV (Jochum et al., 2012).

En conclusion, les virus latents dans les cellules B mémoires favorisent la surexpression de l'IL-10 humaine lors de l'infection, ce qui inhibe la surveillance immunitaire à médiation cellulaire et, parallèlement, permet la prolifération des cellules B infectées. Une fois exprimé, l'IL-10 viral inhibe la surveillance immunitaire à médiation cellulaire, assurant une réinfection par l'EBV. Durant la phase de latence de l'EBV, les cellules immortalisées par le virus surexpriment l'IL-10 humain pour assurer la prolifération des lymphocytes B, induisant en cas de déficit immunitaire l'émergence de lymphomes B liés à l'EBV (Dueñas et al., 2017, revue).

II.2.D. Via le TGF-beta1

Le TGF-beta1 (TGF-β1) a été cloné en 1985 par Derynck et ses collaborateurs (Derynck et al., 1985) Madisen et son équipe ont cloné le gène codant pour le TGF-β2 en 1988. Le clone isolé était issu d'une lignée de cellules humaines d'adénocarcinome prostatique traitée au tamoxifène (Madisen et al., 1988). Il existe trois isoformes de TGF-β : TGF-β1, -β2 et β3. Il s'agit d'une cytokine possédant des fonctions immunosuppressives, en influençant le développement des cellules de l'immunité, l'induction de la tolérance immunitaire, la différenciation et l'homéostasie cellulaire (Sheng et al., 2015, revue). TGF-β est un régulateur essentiel de l'immunité innée et adaptative dans les maladies auto-immunes

chez l'Homme. Il joue également un rôle important dans le cancer, en inhibant l'immunosurveillance chez l'hôte porteur de la tumeur (Sheng et al., 2015, revue).

Concernant l'EBV, le TGF- β 1 est impliqué dans la réactivation virale, en conduisant au passage des cellules en phase de latence au cycle lytique de l'EBV. Cette réactivation s'opère grâce à l'activation du gène *BZLF1*, avec la coopération des protéines Smad et c-Jun/c-Fos (Liang et al., 2002; Iempridee et al., 2011).

Xu et ses collaborateurs ont découvert des niveaux élevés de TGF- β 1 dans le sérum des patients atteints de carcinome nasopharyngé, comparé aux individus sains. De plus, les niveaux de cette cytokine sont significativement plus élevés dans les sérums des patients atteints d'un stade avancé de la pathologie, par rapport à des patients affectés à des stades plus précoces. La recherche du niveau d'expression de TGF- β 1 pourrait aider au diagnostic et au pronostic des patients atteints de NPC (Xu et al., 1999).

Liu et al ont montré que l'expression de TGF- β 1, conjointe à la méthylation du promoteur du gène *rétinoblastome (RB)*, sont corrélés aux cancers gastriques (CG) EBV-positifs et négatifs. La détection de la méthylation et de l'expression du rétinoblastome et de TGF- β 1 peut être utile pour juger le statut de l'invasion tumorale et des métastases des ganglions lymphatiques dans les carcinomes gastriques (Liu et al., 2012).

Sides et ses collaborateurs ont montré que l'oncoprotéine LMP1 agit de manière synergique avec TGF- β 1, afin d'induire la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) dans les cellules épithéliales du poumon (Sides et al., 2011). LMP1 peut agir comme un récepteur constitutionnellement actif au TNF- α , elle peut donc jouer un rôle dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire. L'activation de la voie de signalisation ERK est essentielle pour la TEM induite par le TGF- β 1. Les données des auteurs, obtenues *in vitro*, pourraient expliquer que les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) (dont on ne connaît pas la cause), dont les cellules épithéliales pulmonaires sont LMP1-positives, décèdent plus rapidement que les patients chez lesquels LMP1 n'est pas détectée (Sides et al., 2011).

Selon Morris et al, l'oncoprotéine LMP1 peut moduler l'adhésion cellulaire, en régulant l'activine et TGF- β 1 (Morris et al., 2016). Ces résultats indiquent que LMP1 serait impliquée dans la pathogenèse des carcinomes nasopharyngés, en contribuant au potentiel métastatique des cellules épithéliales (Morris et al., 2016).

II.2.E. Via PD-L1

PD-L1/CD274/B7-H1 est une molécule immuno-inhibitrice qui inhibe l'activation des lymphocytes T, conduisant à la progression des tumeurs (Wang et al., 2016b, revue). La surexpression de PD-L1 (Program Death-Ligand 1) dans les cancers tels que le cancer gastrique, le carcinome hépatocellulaire, le cancer du rein, de l'œsophage, du pancréas, de l'ovaire et de la vessie sont associés à des résultats cliniques médiocres (Wang et al., 2016b, revue).

La surexpression de PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses entraîne une anergie locale de la réponse adaptative anti-tumorale (Brogden et al., 2016, revue). L'inhibition de la réponse adaptative se traduit par la diminution de la survie et l'augmentation de l'apoptose des cellules T, et par la répression de la libération de cytokines (Tseng et al., 2001; Dong et al., 2002). Cela conduit à l'épuisement des cellules T et à l'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral (Jiang et al., 2015, revue).

L'expression de PD-L1 est retrouvée dans de nombreuses pathologies liées à l'EBV. Une forte expression de la protéine PD-L1 a été trouvée dans la majorité des cellules issues de lymphome de Hodgkin classique, de lymphome médiastinal primitif à grandes cellules B, de lymphome B à grandes cellules riche en cellules T/histiocytes EBV positifs, de PTLD EBV-positifs et négatifs, de lymphome B diffus à grandes cellules associés à l'EBV, de lymphome plasmablastique, de lymphome extranodal T/NK, et de carcinome nasopharyngé. Au sein de ces tumeurs, PD-L1 est fortement exprimée par les cellules malignes et les macrophages infiltrant les tumeurs (Chen et al., 2013).

Cette molécule est surexprimée dans le lymphoépithéliome pulmonaire (type de carcinome indifférencié) lié à l'EBV, et est associée à une mauvaise survie globale des patients (Fang et al., 2015).

Paydas et ses collaborateurs ont montré que la co-expression de PD-1 et de PD-L1, associée à l'expression des EBERs, est retrouvée dans les lymphomes de Hodgkin. Ils révèlent que la co-expression de PD-1 et PD-L1 est corrélée à une survie des patients plus courte, alors que l'expression seule de PD-1 ou PD-L1 n'est pas corrélée à la survie (Paydas et al., 2015).

Fang et al ont identifié que PD-L1 est régulé positivement par l'oncoprotéine LMP1 et la voie de signalisation de l'IFN- γ dans les lignées issues de NPC EBV-positives. Les auteurs révèlent que LMP1 augmente l'expression de PD-L1 par les voies STAT3, AP-1 et NF- κ B. L'interféron-gamma agit indépendamment de ces voies, mais de manière synergique avec

LMP1 dans la surexpression de PD-L1, au sein des NPC. Ils montrent également que l'expression de PD-L1 est associée à un taux de survie médiocre chez les patients atteints de NPC (Fang et al., 2014).

Selon Saito et ses collaborateurs, l'expression de PD-L1 est fréquemment détectée dans les cellules cancéreuses provenant de cancer gastrique associé à l'EBV (EBVaGC), avec infiltration des cellules immunitaires dans leur stroma. L'expression de PD-L1 dans les cellules cancéreuses est associée au mauvais pronostic de survie des patients atteints d'EBVaGC. L'expression de PD-L1 dans les cellules malignes et leur microenvironnement peut ainsi contribuer au développement du cancer gastrique associé à l'EBV (Saito et al., 2017).

Des travaux effectués *in vivo* mettent en exergue des avancées thérapeutiques prometteuses, en ciblant PD-1 par un système CRISPR-Cas9 dans les cancers gastriques associés à l'EBV. Combiné avec une radiothérapie à faible dose, le ciblage de PD-1 sur les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) médie un effet anti-tumoral important dans un modèle murin de xénogreffe d'EBVaGC. Cette étude illustre la tolérance immunitaire médiée par l'axe PD-1/PD-L1 des EBVaGC, et propose de cibler ce point de contrôle immunitaire pour rompre cette tolérance, en s'appuyant sur l'immunothérapie adoptive basée sur les lymphocytes T (Su et al., 2017).

Il a été montré que B7-H1 (PD-L1), est surexprimé à la surface des lymphocytes B immortalisés en programme de latence III de l'EBV (LCLs) (Durand-Panteix et al., 2012).

Les auteurs montrent que le programme de latence III augmente les quantités de lysosomes sécrétoires contenant PD-L1, et contribuent à son export vers la surface cellulaire. A l'opposé, c-Myc réprime la polymérisation de l'actine, bloquant ainsi la migration des lysosomes sécrétoires et l'export de PD-L1 (Durand-Panteix et al., 2012).

Bi et son équipe ont montré que PD-L1 est régulé positivement par le sous-programme NF- κ B de LMP1, et est corrélé à un mauvais pronostic chez les patients atteints de lymphomes à cellules T/NK (NKTCL) (Bi et al., 2016a).

Partie 3 : Les cellules B régulatrices (Bregs)

Une première partie sera consacrée à la découverte, à l'identification des différents sous-types, à l'origine et à l'induction des cellules B régulatrices. Leurs mécanismes d'action seront ensuite décrits. Une section traitera spécifiquement des lymphocytes T régulateurs, qui peuvent être induits par certaines populations de Bregs. Enfin, les pathologies liées aux Bregs feront l'objet d'une dernière partie.

I/ Historique de la découverte des Bregs

En 1974, des expérimentations effectuées sur des cobayes ont révélé que les cellules B peuvent supprimer les réactions d'hypersensibilité retardées, ce qui implique l'effet inhibiteur des cellules B sur la fonction des lymphocytes T (Katz et al., 1974; Neta and Salvin, 1974). D'autres preuves de ce phénotype ont été mises en avant plus de deux décennies plus tard, avec l'observation d'une inflammation exacerbée en l'absence de cellules B dans un modèle auto-immun murin (Wolf et al., 1996a). Bien qu'il ait été montré que les lymphocytes B pouvaient jouer un rôle dans la réponse inflammatoire, ce n'est qu'en 2000 que Mizoguchi et al. décrivent un sous-ensemble de cellules B qui inhibe, et non promeut la réponse inflammatoire dans un modèle murin de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) (Mizoguchi et al., 2000). Ce sous-type cellulaire B, aux propriétés particulièrement suppressives, est nommé « cellules B régulatrices », ou « Bregs ». Depuis, la déficience de la fonction des Bregs ou la diminution du nombre de Bregs ont été observées dans des maladies impliquant des réponses immunitaires pro-inflammatoires incontrôlées ; plus largement dans les maladies auto-immunes et les transplantations rénales (Newell et al., 2010; Silva et al., 2012; Fillatreau et al., 2002; Matsushita et al., 2008). Sur le plan fonctionnel, les Bregs sont définies par leur capacité à inhiber les réponses inflammatoires par le biais de cytokines immunosuppressives. Les cytokines impliquées dans les réponses anti-inflammatoires sont principalement l'IL-10, TGF- β , et l'IL-35, identifié plus récemment (Tian et al., 2001; Fillatreau et al., 2002; Shen et al., 2014; Rosser and Mauri, 2015). En 2015, Mauri et Menon ont établi un consensus caractérisant les sous-types de Bregs murins et humains, en fonction de leurs caractéristiques phénotypiques et de leurs mécanismes de suppression (Mauri and Menon, 2015a).

II/ Identification des sous-types de Bregs humains

La définition des phénotypes de Bregs spécifiques s'est révélée difficile, car plusieurs sous-groupes de cellules B étaient caractérisés comme des régulateurs négatifs de la réponse immunitaire. Les études initiales démontrent que les propriétés immuno-régulatrices de ce sous-type cellulaire sont en majeure partie attribuées à l'IL-10 (Mauri et al., 2003; Fillatreau et al., 2002; Mizoguchi et al., 2002). Depuis, les phénotypes des sous-types de Bregs humains ont été clairement identifiés. Le **Tableau 7** récapitule le consensus actuel quant à leurs différents sous-types, leurs caractéristiques phénotypiques et les molécules responsables de l'immunosuppression.

Sous-types	Phénotype	Mécanismes de suppression
Cellules B immatures	CD19 ⁺ CD24 ^{High} CD38 ^{High}	IL-10, CD274/PD-L1
Cellules B10	CD19 ⁺ CD24 ^{High} CD27 ⁺	IL-10
Cellules B GrB+	CD19 ⁺ CD38 ⁺ CD1d ⁺ IgM ⁺ CD147 ⁺	GrB, IL-10, IDO
Cellules Br1	CD25 ^{High} CD71 ^{High} CD73 ^{Low}	IL-10, IgG4
Plamasblastes	CD27 ^{Int} CD38 ^{High}	IL-10
-	CD39 ⁺ CD73 ⁺	Adenosine (IL-10)
iBregs	-	TGF-β1, IDO
tBregs	CD19 ⁺ CD25 ^{High} CD69 ^{High} PD-L1 ^{High} CD81 ^{High} CD86 ^{High} CD62L ^{Low} IgM ^{Int}	TGF-β

Tableau 7 : Différents sous-types de Bregs humains.

D'après (Olkhanud et al., 2011; Mauri and Menon, 2015a)

II.1. Cellules B immatures

Une population de Bregs immatures CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} a été rapportée dans le sang périphérique de personnes saines (Blair et al., 2010). Lors de l'engagement du CD40 *in vitro*, la sous-population de cellules CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} produit les plus fortes quantités d'IL-10 parmi les sous-types de cellules B. Elle a la capacité de supprimer la différenciation des cellules Th1 et d'inhiber les réponses Th1 et Th17. Ce sous-ensemble est

capable d'induire la différenciation des cellules CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs (Tregs) et en cellules Tr1 (Flores-Borja et al., 2013).

L'inhibition de la réponse Th1 par les Bregs est en partie dépendante de l'IL-10 et nécessite l'interaction CD80-CD86 avec les cellules T (Blair et al., 2010).

Cherukuri et al proposent que le rapport de l'expression de l'IL-10 par rapport au TNF- α par les cellules CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} pourrait servir de mesure de la polarisation des cytokines, et constituerait un meilleur indicateur de la fonction des Bregs que l'expression de l'IL-10 seule (Cherukuri et al., 2014).

II.2. Cellules B10

La population de Bregs produisant de l'IL-10, nommée B10, a été découverte dans le sang périphérique humain (Iwata et al., 2011). La majorité des cellules B10 ont été trouvées dans la sous-population de lymphocytes B CD19⁺ CD24^{High} CD27⁺. 60% des cellules B10 expriment le CD38. Le marqueur CD27 permet la discrimination des cellules B10 par rapport aux Bregs immatures (Iwata et al., 2011). Ces cellules sur-expriment également le CD48 et le CD148. Le CD48 est un marqueur d'activation des cellules B (Yokoyama et al., 1991). Le marqueur CD148 est considéré comme un marqueur des cellules B mémoires humaines (Tangye et al., 1998). Contrairement à la population des Bregs immatures activées par le CD40, les cellules B10 humaines répondent à la stimulation au LPS et au CpG. Les cellules B10 régulent négativement la capacité des cellules dendritiques à présenter les antigènes, et modulent indirectement la prolifération des cellules T (Matsushita et al., 2010). Il a été démontré que les cellules B10 altèrent significativement les réponses IFN- γ et le TNF- α *in vitro* (Matsushita et al., 2010), ainsi que l'IFN- γ *in vivo* (Yoshizaki et al., 2012), par des antigènes spécifiques des lymphocytes CD4⁺.

Bouaziz et ses collaborateurs ont découvert que la production de l'IL-10 par les cellules B10 humaines inhibe la prolifération des cellules T CD4⁺ CD25⁻ spécifiques des antigènes (Bouaziz et al., 2010). Cette sous-population de lymphocytes B peut réguler négativement la production cytokinique des monocytes, par une voie dépendante de l'IL-10 durant des tests fonctionnels *in vitro* (Iwata et al., 2011).

II.3. Cellules B GrB+

Lindner et ses collaborateurs ont montré que des cellules B exprimant le granzyme B (GrB) et possédant un phénotype CD19⁺ CD38⁺ CD1d⁺ IgM⁺ CD147⁺, peuvent infiltrer les tumeurs et réguler négativement les réponses lymphocytaires T. Selon les auteurs, les Bregs GrB⁺ sont induites par l'IL-21, et expriment les molécules régulatrices telles que l'IL-10, l'indoléamine-2,3-dioxygénase (IDO) (une enzyme permettant la dégradation du tryptophane) et le CD25 (Lindner et al., 2013).

II.4. Cellules Br1

Van de Veen et son équipe ont décrit pour la première fois les cellules régulatrices Br1. Ces cellules sont productrices d'IL-10, et présentent un phénotype CD25^{High} CD71^{High} CD73^{Low} (van de Veen et al., 2013). Elles jouent un rôle important dans la tolérance aux allergènes en diminuant la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques des antigènes, et en produisant des anticorps IgG4 anti-inflammatoires contribuant à la tolérance périphérique (van de Veen et al., 2013).

Noh et son équipe ont montré que les cellules Br1 peuvent être impliquées dans la tolérance immunitaire contre les allergies alimentaires en produisant de l'IL-10, et en mourant simultanément par apoptose chez l'Homme (Noh et al., 2010). Ils montrent dans une autre étude que ces cellules conduisent à un changement de l'effet tolérogène, via l'IFN- γ , dans l'allergie alimentaire IgE-indépendante (Noh et al., 2012).

II.5. Plasmablastes régulateurs

Une sous-population de Bregs a été décrite comme productrice d'IL-10, avec un phénotype CD27^{Int/High} CD38^{High}. Matsumoto et ses collaborateurs ont découvert que ces plasmablastes régulateurs peuvent exercer des fonctions régulatrices dans les maladies liées à l'inflammation auto-immune (Matsumoto et al., 2014).

Franquesa et al ont montré que les cellules souches mésenchymateuses dérivées des tissus adipeux humains abrogent la formation de plasmocytes et induisent la différenciation de cellules B régulatrices CD19⁺ CD27^{High} CD38^{High}, indépendamment des cellules T helpers (Franquesa et al., 2015).

II.6. Cellules CD39⁺ CD73⁺

Indépendamment de l'IL-10, Saze et *al* ont découvert que les cellules B circulantes CD39⁺ CD73⁺ peuvent exercer des fonctions immunosuppressives chez l'homme. Ces cellules hydrolysent l'ATP exogène en Adénosine-5' MonoPhosphate (5'-AMP) et en adénosine (ADO). Ce sous-type de Breg est capable d'inhiber la prolifération des cellules T et la production de cytokines *in vitro* (Saze et al., 2013).

Récemment, Figueiró et ses collaborateurs ont démontré que l'expression de CD73 est augmentée en présence de cellules B CD39^{High}. Les cellules CD39^{High} co-cultivées avec des lymphocytes T effecteurs autologues suppriment l'activation et la prolifération des cellules T, et sécrètent des niveaux élevés d'IL-6 et d'IL-10. L'ectonucléotide CD39 est régulé positivement dans un sous-ensemble de cellules B activées *in vitro* qui utilisent l'adénosine et l'IL-10 pour supprimer les fonctions des lymphocytes T effecteurs. Contrairement aux travaux décrits par Saze et *al*, les chercheurs prouvent que ce sous-type de Bregs humains utilise en partie l'IL-10 pour mener à l'immunosuppression (Figueiró et al., 2016).

II.7. Bregs induites

Les Bregs induites (iBregs) sont caractérisées par la production de TGF- β et de l'Indoleamine 2,3-DiOxygénase (IDO) pour induire l'expansion de cellules T régulatrices (Tregs) sécrétant de l'IL-10 et du TGF- β . Nouël et *al* ont montré que la prolifération de ces iBregs nécessite une stimulation par la protéine CTLA-4 des lymphocytes T (Nouël et al., 2015).

II.8. tBregs

Les tumor-evoked regulatory B-cells (tBregs) ont été décrites par Olkhanud et son équipe en 2011. Les tBregs présentent un phénotype de cellules B2 matures peu proliférantes (CD19⁺ CD25^{High} CD69^{High}). Elles expriment constitutivement la forme activée de STAT3, et sont caractérisées par un phénotype PD-L1^{High} CD81^{High} CD86^{High} CD62L^{Low} IgM^{Int} (Olkhanud et al., 2011). Grâce à un modèle murin de cancer du sein, les auteurs ont montré que les tBregs jouent un rôle majeur dans le développement des métastases pulmonaires. Les tBregs induisent la différenciation des cellules T CD4⁺ naïves en Tregs FoxP3⁺, par le biais d'un mécanisme dépendant du TGF- β (Olkhanud et al., 2011).

III/ Origine des Bregs

A ce jour, il n'existe pas de théorie claire quant à l'origine des Bregs. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer la diversité des sous-ensembles de Bregs. Mauri et Menon ont décrit trois modèles principaux dans une de leurs revues. Les sous-types différents des Bregs pourraient provenir de progéniteurs individuels, qui conduiraient à la différenciation de sous-ensembles distincts de Bregs. Il s'agirait de lignées multiples de Bregs.

Le second modèle serait basé sur une lignée unique de Breg. Dans cette hypothèse, tous les différents sous-types de Bregs proviendraient d'un seul progéniteur et exprimeraient un unique facteur de transcription, non identifié à ce jour. Les Bregs ne se trouveraient pas dans un état différencié et pourraient présenter des fonctions suppressives aux différents stades de différenciation. Les Bregs induites constituent le troisième modèle proposé par les auteurs. Cette hypothèse est basée sur le fait que toute cellule B peut devenir régulatrice lors de l'exposition aux stimuli environnementaux spécifiques, et présenter un potentiel suppressif (Mauri and Menon, 2015a). Cette dernière théorie est soutenue par des résultats montrant que la stimulation avec différentes combinaisons de cytokines induit différents sous-types de Bregs (Schubert et al., 2015; Rosser et al., 2014; Yoshizaki et al., 2012).

La **Figure 24** présente les différents modèles possibles de génération des sous-types de Bregs

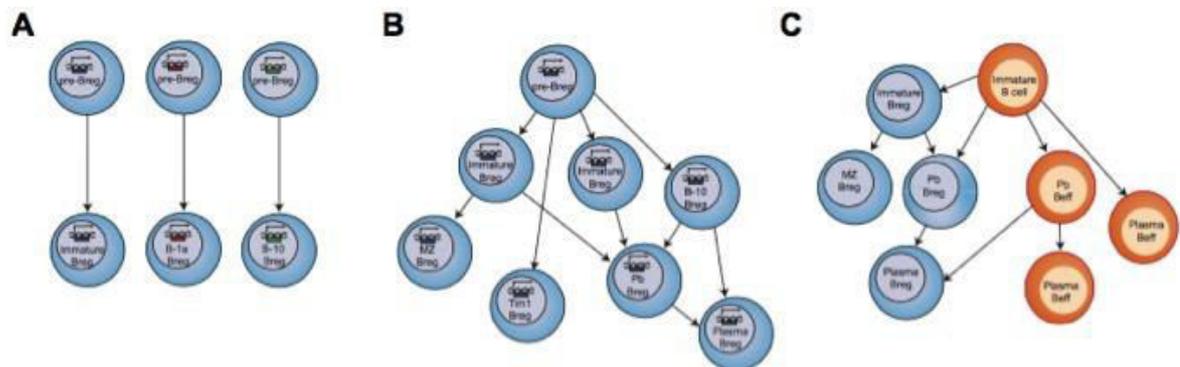


Figure 24 : Modèles de développement des Bregs.

A. Lignées multiples de Bregs. Dans ce modèle, différents sous-groupes de Bregs proviennent de progéniteurs individuels. **B.** Lignée unique de Breg. Tous les sous-ensembles décrits proviennent d'un seul progéniteur et expriment un unique facteur de transcription. Les Bregs ne sont pas dans un état différencié et peuvent acquérir les fonctions suppressives à différents stades de différenciation. **C.** Bregs induites. Selon cette hypothèse, toute cellule B peut acquérir ses fonctions régulatrices lors de l'exposition à des stimuli environnementaux. D'après (Mauri and Menon, 2015a).

Les marqueurs de surface et les mécanismes de suppression partagés entre les sous-types de Bregs humains et murins soulèvent plusieurs questions intéressantes. Sur la base de données immunologiques, il semble que toute cellule B puisse acquérir des fonctions effectrices ou régulatrices, ou présenter les deux fonctions simultanément, comme observé pour les plasmablastes régulateurs et les cellules Br1 (Matsumoto et al., 2014; van de Veen et al., 2013).

Certains travaux suggèrent que les cellules B à différents stades de différenciation (des cellules immatures aux plasmocytes) peuvent acquérir des fonctions suppressives. Ces études révèlent que les Bregs ne se trouvent pas dans un état différencié terminal (Shen et al., 2014; Matsumoto et al., 2014).

IV/ Induction des Bregs

Une des molécules clé des cellules B régulatrices est l'IL-10. Les différentes voies d'induction possibles des Bregs sont essentiellement basées sur la production de cette cytokine immunosuppressive. Les prochains paragraphes porteront sur les principales voies de signalisation pouvant induire les cellules B régulatrices chez l'Homme : le CD40 et le BCR, les TLRs (Toll-Like Receptors), et l'IL-21.

IV.1. Par le CD40 et le BCR

CD40, une molécule co-stimulatrice, est nécessaire pour la génération et la fonction suppressive des cellules B (Kehry, 1996). Le traitement par un anticorps monoclonal agoniste CD40 ou son ligand (CD40L/CD154) active les cellules B pour sécréter la cytokine anti-inflammatoire IL-10 *in vitro* (Duddy et al., 2004; Yanaba et al., 2009).

Shao et son équipe ont découvert que les Bregs promeuvent l'invasion et la croissance du carcinome hépatocellulaire humain (CHH), en interagissant directement avec les cellules cancéreuses du foie, par la voie de signalisation CD40/CD154 (Shao et al., 2014).

Il est admis que la signalisation du BCR (B-Cell Receptor) couplée avec l'activation du CD40 conduit à une induction plus forte de l'IL-10 (Fillatreau et al., 2002).

IV.2. Par les TLRs

Comme évoqué dans la section « Immunité innée », Les TLRs sont des récepteurs qui reconnaissent les motifs moléculaires associés aux pathogènes. Ces motifs peuvent provenir

de diverses origines (bactérie, virus, parasite), et être de nature différente (protéine, ose, acide nucléique) (Pulendran, 2004). Les TLRs jouent un rôle dans l'induction des cellules B régulatrices (van der Vlugt et al., 2014b). De nombreuses études ont été menées chez la souris. Lampropoulou et al ont montré que l'activation des TLRs, tels que le TLR4 et le TLR9 des cellules B *via* la voie de signalisation de Myd88, peut induire des cellules régulatrices immunosuppressives sécrétant de l'IL-10 *in vitro*. La signalisation TLR dans les cellules B supprime les réponses inflammatoires de type Th1 et Th17 des lymphocytes T chez la souris (Lampropoulou et al., 2008).

Les cellules B humaines expriment TLR9, qui est un récepteur pour le CpG, contrairement à TLR4. Bouaziz et ses collaborateurs ont identifié que le TLR9 est un puissant inducteur de la production d'IL-10. Ils ont montré que le stimulus optimal pour la production de cette cytokine est la combinaison de CpG et d'anti-immunoglobuline (anti-Ig), qui peut agir de manière synergique pour induire la production d'IL-10 par les cellules B humaines. Les cellules B stimulées de cette façon ont la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻, par un mécanisme partiellement dépendant de l'IL-10. Ils ont également identifié que l'activation de TLR9 est impliquée dans la production de l'IL-10 par les cellules humaines B CD27⁺, ou les lymphocytes B transitionnels CD38^{High} *ex vivo* (Bouaziz et al., 2010).

IV.3. Par l'Interleukine-21

L'interleukine-21 (IL-21) est une cytokine produite par diverses cellules T CD4⁺ activées, incluant les cellules Th1 et Th17, les cellules tueuses naturelles T (NKT), et les lymphocytes T helpers folliculaires (Tfh) (Santegoets et al., 2013). Cette interleukine joue un rôle dans la différenciation et la prolifération des cellules B, mais également des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ (Santegoets et al., 2013). Elle est aussi capable d'induire certaines populations de cellules B régulatrices. Lindner et ses collaborateurs ont montré que l'IL-21 induit la sous-population de Bregs GrB⁺ (Lindner et al., 2013). Ils ont également découvert l'existence de cellules B humaines avec un phénotype régulateur dans des infiltrats de tumeurs solides, tels que les carcinomes du sein, des ovaires, cervical, colorectal ou de la prostate. Ces données peuvent contribuer à la suppression des réponses immunitaires anti-tumorales (Lindner et al., 2013).

Yang et al ont montré que les cellules Tfh médient l'expansion de cellules B régulatrices *via* l'IL-21 dans un modèle murin de lupus. L'IL-21 induit la production d'IL-10 par activation

de la transduction du signal de STAT3 phosphorylé (pSTAT3). Ils mettent en évidence que l'IL-10 induite par l'IL-21 exerce une fonction régulatrice en inhibant la prolifération des cellules T. Ces données suggèrent que les cellules Tfh médient non seulement les réponses immunitaires humorales et augmentent l'auto-immunité, mais jouent également un rôle plus large dans les actions de régulation immunitaire grâce à l'induction de la production d'IL-10 via l'IL-21 (Yang et al., 2013).

V/ Mécanismes d'action des Bregs

V.1. Par des facteurs solubles

Les Bregs peuvent produire trois cytokines immunosuppressives : l'IL-10, le TGF- β 1 et l'IL-35.

V.1.A. L'interleukine-10

Comme indiqué dans la section « Facteurs cellulaires favorisant l'émergence et le développement des tumeurs », l'interleukine-10 est une cytokine immunosuppressive impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, en diminuant les réponses inflammatoires aux infections (Sarvaria et al., 2017, revue).

Les cellules B productrices d'IL-10 peuvent supprimer les réponses immunitaires inappropriées, en régulant l'équilibre Th1/Th2 et en réduisant directement les réponses inflammatoires médiées par les cellules de l'immunité innée. L'IL-10 peut inhiber la production de cytokines par les macrophages activés. Cette cytokine peut également inhiber l'activation et la prolifération des macrophages, par des voies dépendantes et indépendantes de STAT3 (O'Farrell et al., 1998).

Un nombre certain d'études suggère que les cellules B productrices de l'IL-10 sont importantes pour la génération et/ou l'entretien du pool de lymphocytes T régulateurs (Tregs) (Gray et al., 2007; Mann et al., 2007; Carter et al., 2011; Sayi et al., 2011; Blair et al., 2009; Wei et al., 2005; Amu et al., 2010; Tadmor et al., 2011; Sun et al., 2008; Ahangarani et al., 2009).

Bankó et al ont mené le suivi de la phosphorylation des molécules clés de la signalisation cellulaire et ont montré que l'activation de ERK, P38 et CREB (C-AMP Response Element-binding protein) est indispensable pour l'induction de la production de l'IL-10 chez les patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (PR). De plus, la phosphorylation de STAT3

augmente davantage l'expression de l'IL-10 dans la population de Bregs humains (Bankó et al., 2017).

V.1.B. Le TGF-beta

Comme énoncé dans la partie « Facteurs cellulaires favorisant l'émergence et le développement des tumeurs », le TGF- β joue un rôle crucial dans la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs, et promeut ainsi la tolérance immunitaire aux transplantations (Lee et al., 2014a).

Kessel et ses collaborateurs ont caractérisé une sous-population de Bregs CD25^{High} CD1d^{High} IL-10^{High} TGF- β ^{High}. Ce sous-type cellulaire est capable de réguler la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ lorsqu'ils sont en co-culture, par un moyen dépendant du contact cellulaire. Ces résultats suggèrent que la fonction régulatrice des Bregs est dépendante du CD86. Ce type de Breg améliore les propriétés des cellules T régulatrices autologues, en augmentant les niveaux de FoxP3 et de CTLA-4 (Kessel et al., 2012).

V.1.C. L'interleukine-35

L'IL-35 est une cytokine sécrétée par les Bregs et les Tregs, qui joue un rôle dans l'immunosuppression (Sawant et al., 2015, revue). Il s'agit d'une protéine dimérique composée des sous-unités IL-12 α et IL-27 β codées respectivement par les gènes *IL12A* et *EBI3* (Epstein-Barr Induced 3). *IL12A*, ou p35, est une sous-unité de deux cytokines hétérodimériques distinctes : l'IL12 et l'IL35. L'IL12 est composée d'une sous-unité de 40 kDa (p40 ou IL12B) et d'une autre de 35 kDa (p35) dont les fonctions sont d'activer les réponses immunitaires innées et acquises (Wolf et al., 1994). *EBI3* s'associe avec *IL12A* pour former l'IL-35.

Wang Z et son équipe ont montré que l'IL-35 dérivé de tumeurs promeut la croissance tumorale grâce à l'accumulation de cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-Derived Suppressor Cells), l'accroissement de l'angiogenèse et la suppression de l'immunité anti-tumorale (Wang et al., 2013).

V.2. Par l'enzyme Indoléamine 2,3-Dioxygénase

L'enzyme Indoléamine 2,3-Dioxygénase (IDO) permet la dégradation du tryptophane par la voie de la kynurénine (voie métabolique conduisant à la production de NAD⁺). Elle est

impliquée dans l'immunité cellulaire en régulant négativement la prolifération des lymphocytes T, et en inhibant leur différenciation en lymphocytes Th17 (Baban et al., 2009). La forme active de cette enzyme est principalement induite chez les macrophages humains et les cellules dendritiques dérivées des monocytes, lors de l'interaction avec les lymphocytes T. L'induction dépend non seulement de la production de l'interféron-gamma (IFN- γ), mais également de la surexpression du ligand de CD40 (CD40L) sur ces lymphocytes T (Hwu et al., 2000; Munn et al., 1999). Les actions immunosuppressives de l'IDO sont médiées par la privation des tryptophanes et l'accumulation de métabolites toxiques du tryptophane, entraînant l'inhibition de la prolifération (Munn et al., 1999; Terness et al., 2002; Frumento et al., 2002), l'anergie (Munn et al., 2004) ou l'apoptose des lymphocytes T (Fallarino et al., 2002).

Selon Fallarino et al, les effets combinés de la privation en tryptophane et l'accumulation des métabolites de cet acide aminé conduisent à la conversion de cellules T naïves CD4⁺ en lymphocytes T régulateurs (Fallarino et al., 2006). Sharma et son équipe ont montré que l'IDO permet l'activation des lymphocytes T régulateurs matures (Sharma et al., 2007).

Nouël et ses collaborateurs ont identifié que les cellules B activées par le CpG régulent la prolifération des lymphocytes T en produisant l'enzyme IDO et le TGF- β . La production d'IDO et de TGF- β conduit non seulement à l'induction de lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs), mais aussi à celle de cellules T CD4⁺ productrices de TGF- β et de cellules T régulatrices productrices d'IL-10. Selon les auteurs, CTLA-4 induit des cellules B pour produire des IDO et devenir des cellules B régulatrices induites (iBregs) (Nouël et al., 2015).

V.3. Par l'axe PD-1/PD-L1

L'axe PD-1/PD-L1 est impliqué dans les cancers et les maladies auto-immunes. Ce point de contrôle immunologique joue un rôle important dans les capacités immunosuppressives des cellules B régulatrices. De nombreux essais cliniques réussis ont été menés avec des anticorps monoclonaux visant à bloquer PD-1 et/ou PD-L1. La revue de Iwai et ses collaborateurs récapitule les différents traitements existants contre PD-1 et son ligand, ainsi que les difficultés actuelles dans leur utilisation clinique (Iwai et al., 2017). La **Figure 25** présente des recherches de traitement ciblant PD-1, ou PD-L1 et PD-L2.

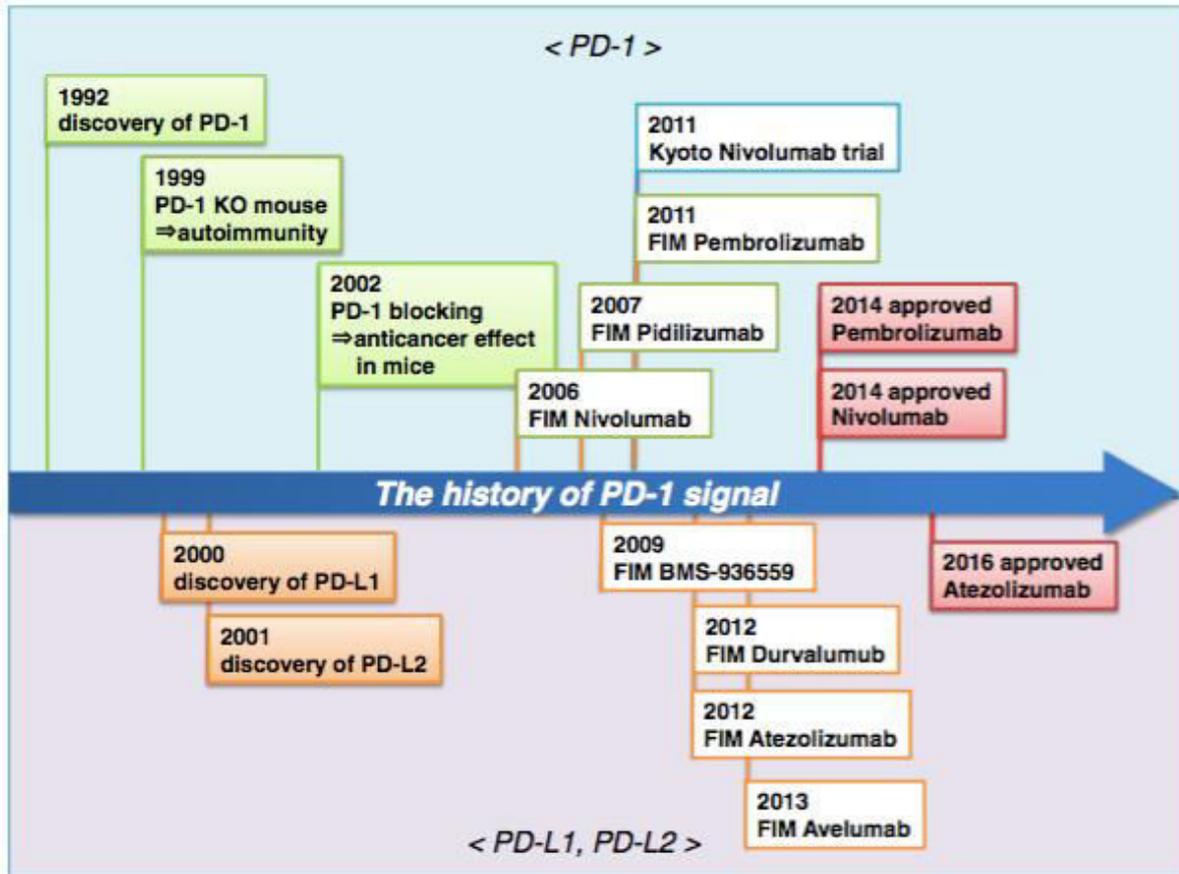


Figure 25: Traitements ciblant PD-1 et ses ligands, PD-L1 et PD-L2.

FIM : First In Man. D'après (Iwai et al., 2017).

D'après Khan et ses collaborateurs, les Bregs jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'immunité humorale médiée par les lymphocytes T helper folliculaires CD4⁺ CXCR5⁺ PD1⁺ (Khan et al., 2015). L'expression élevée de PD-L1 peut supprimer l'inflammation dans les maladies auto-immunes. Les auteurs ont identifié que ces cellules sont résistantes à une déplétion ciblant les cellules CD20. Ce travail décrit la manière dont les Bregs sont essentielles dans l'homéostasie humorale, et peuvent avoir des implications pour la régulation des maladies auto-immunes (Khan et al., 2015).

V.4. Par induction de lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs participent à la tolérance immunitaire en inhibant la prolifération des lymphocytes T effecteurs. Un nombre anormalement élevé de Tregs conduit

à la suppression des réponses immunitaires médiées par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ce qui peut entraîner une prolifération non contrôlée des cellules tumorales.

Flores-Borja et son équipe ont montré que les Bregs chez l'Homme (CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High}) inhibent la différenciation des cellules T naïves en cellules T helper 1 et 17 (Th1 et Th17). Elles convertissent également les cellules CD4⁺ CD25⁻ en lymphocytes T régulateurs, mécanisme partiellement dépendant de l'IL-10 (Flores-Borja et al., 2013).

VI/ Les Lymphocytes T Régulateurs

VI.1. Historique de la découverte des Tregs

En 1970, Gershon et Kondo ont découvert que les lymphocytes T sont capables non seulement d'augmenter les réponses immunitaires, mais également de les diminuer. Cette régulation négative est médiée par des lymphocytes T différents des cellules T helpers (Gershon and Kondo, 1970). Cette population de lymphocytes T, appelée « cellules T suppressives », a été intensivement étudiée au cours des années suivantes dans divers domaines de l'immunologie. Le phénotype des lymphocytes T suppresseurs, évalué par l'expression de Lyt-1 (CD5) et Lyt-2 (CD8), étaient pour la plupart Lyt-2⁻, actuellement dénommées cellules T CD8⁺. Toutefois, certains d'entre eux, en particulier ceux qui suppriment l'hypersensibilité retardée, étaient Lyt-1⁺ 2⁻, actuellement dénommées cellules T CD4⁺. Les cellules suppressives T CD8⁺ étaient sensées exprimer la molécule I-J, molécule clé associée à leur fonction suppressive (Green et al., 1983).

La recherche active sur les cellules T suppressives s'est effondrée dans les années 1980, lorsque l'étude du gène du CMH de la souris a montré qu'il ne présentait aucune existence de la région I-J. (Kronenberg et al., 1983). Il était jusqu'alors supposé que le gène du CMH codait pour les polypeptides I-J et que ceux-ci étaient localisés au sein du complexe du gène du CMH.

A la fin des années 1980 et au début des années 1990, les chercheurs avaient limité l'utilisation des termes « cellules T suppressives » à l'interprétation des phénomènes immunologiques suppressifs ou inhibiteurs (Bloom et al., 1992).

La caractérisation moléculaire de diverses cytokines, y compris l'IL-10 aux fonctions immunosuppressives, a révélé leur pléiotropie, leur régulation commune et leur redondance de fonction vis-à-vis des lymphocytes T (O'Garra and Murphy, 1994). Ces résultats ont généré un concept selon lequel les phénomènes suppresseurs impliquant les lymphocytes T

ont été attribués aux cellules T sécrétant des cytokines immunosuppressives, avec un rôle peu significatif joué par les « anciennes » cellules T suppressives. Dans un tel contexte, il est compréhensible que les cellules T_R produisant de l'IL-10, appelées Tr1, produites *in vitro* par stimulation antigénique de lymphocytes T naïfs en présence d'IL-10 ou de cellules T_R sécrétrices de TGF-beta (nommées Th3) ont rencontré peu de difficultés à être acceptées. Ces cellules étaient obtenues à partir de souris étudiées pour la tolérance orale (tolérance immunologique vis-à-vis d'un antigène administré par voie orale) (Chen et al., 1994; Groux et al., 1997b).

Les « cellules T régulatrices » (Tregs) ont été identifiées comme une sous-population de lymphocytes T CD4⁺ exprimant des niveaux élevés de CD25 ou des faibles niveaux de CD45RB. Ces cellules avaient la capacité de diminuer les symptômes de la pathologie auto-immune induite par la thymectomie néonatale, ou de permettre la reconstitution de rongeurs lymphopéniques (Sakaguchi et al., 1995; Smith et al., 1991; Morrissey et al., 1993; Suri-Payer et al., 1998).

L'événement majeur qui a conduit à l'acceptation générale des cellules Tregs en tant que phénotype distinct a été l'identification du facteur de transcription FoxP3 (Forkhead box P3) (Chatila et al., 2000; Brunkow et al., 2001; Wildin et al., 2001), et de son expression pour l'ensemble des cellules Tregs (Fontenot et al., 2005b; Wan and Flavell, 2005).

Les cellules Tregs FoxP3⁺ utilisent les chaînes alpha et beta du TCR pour la reconnaissance antigénique, et possèdent un large répertoire antigénique, qui est comparable en taille mais différent en composition par rapport aux lymphocytes T CD4⁺ conventionnels (Tconv) (Hsieh et al., 2006; Pacholczyk et al., 2006; Wong et al., 2007).

Le phénotype anergique des Tregs *in vitro* reflète la forte dépendance de ces cellules à l'IL2. Ils ne peuvent pas synthétiser cette cytokine mais elle est la clé de leur différenciation, de leur homéostasie et de leur fonction (Furtado et al., 2002; Thornton et al., 2004; Fontenot et al., 2005a).

VI.2. Origine des Tregs

Deux origines ont été décrites pour les cellules FoxP3⁺. La plupart des lymphocytes T FoxP3⁺ se différencient dans le thymus, à partir de précurseurs immatures doubles positifs CD4⁺ CD8⁺, comme une alternative au développement des cellules CD4⁺ conventionnelles. La seconde origine se produit dans le sang périphérique, où un certain nombre d'éléments

déclencheurs induit l'expression de FoxP3 dans les cellules T conventionnelles (Dhamne et al., 2013).

Les premiers sont communément appelés « naturels » (nTregs) ou « dérivés du thymus » (tTregs). Les seconds sont généralement connus sous les qualificatifs « induits » (iTregs) ou « périphériques » (pTregs).

VI.3. Différentes classes de Tregs

VI.3.A. Les lymphocytes T régulateurs naturels

Les lymphocytes T régulateurs naturels (nTregs) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ sécrètent de l'IL-10 et du TGF-beta. Il s'agit du sous-ensemble le plus représenté des Tregs. Ces cellules proviennent du thymus en réponse aux auto-antigènes. Elles contribuent au contrôle des réponses immunitaires spécifiques des allergènes de plusieurs manières. Les nTregs peuvent notamment inhiber le développement des cellules dendritiques, qui permettent la génération de cellules T effectrices. Elles inhibent les cellules effectrices Th1, Th2, Th17 ainsi que les réponses IgE spécifiques aux allergènes et l'induction des IgG4. Elles contribuent à la suppression des mastocytes, basophiles et éosinophiles, interagissent avec les cellules tissulaires et suppriment la migration des cellules T effectrices vers les tissus (Akdis and Akdis, 2009, revue).

D'après Seddiki et al, il existe une corrélation inverse entre l'expression de FoxP3 et de CD127 dans les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺, ce qui suggère que l'expression de CD127 à la surface cellulaire peut être utilisée comme une alternative à l'identification du facteur de transcription FoxP3 pour mettre en évidence et isoler les Tregs humains lors d'analyses fonctionnelles (Seddiki et al., 2006).

VI.3.B. Les lymphocytes T régulateurs ICOS⁺

Les Tregs ICOS⁺ (Inducible T-Cell COstimulator) se distinguent de toutes les autres populations FoxP3⁺ par l'expression de l'IL-10, de l'IL-17 et de l'interféron-gamma (IFN- γ). Les Tregs ICOS⁺ dérivent de l'expansion des nTregs, et expriment des niveaux élevés de la protéine ICOS *in vivo* suite à une sensibilisation avec le 2,4 dinitro-fluorobenzène. Ils ont la capacité d'inhiber spécifiquement les lymphocytes T CD8⁺ reconnaissant l'haptène (Vocanson et al., 2010). Ce sous-ensemble de Tregs exprime constitutivement des niveaux élevés de CD25 (IL2R α) et de CD39. Sim et son équipe se sont intéressés à l'effet d'une

forme mutante d'IL2 qui se lie préférentiellement à l'IL2R $\beta\gamma$ d'affinité inférieure. Ils ont mis en évidence une liaison réduite à CD25 sur les Tregs, les cellules NK effectrices et des sous-groupes de lymphocytes T. Ils ont découvert que ce variant régule négativement l'expansion des Tregs ICOS⁺, promeut l'activation des cellules NK et inhibe la croissance tumorale de mélanomes plus efficacement que l'IL2 sauvage (Sim et al., 2016).

VI.3.C. Les lymphocytes T régulateurs induits

Les lymphocytes T régulateurs induits (iTregs) ont les mêmes caractéristiques phénotypiques que les nTregs, et sécrètent également l'IL-10 et le TGF-beta. Contrairement aux nTregs, les iTregs sont induits en périphérie. Les cellules T CD4⁺ naïves expriment FoxP3 en périphérie en réponse à des antigènes étrangers, et ces cellules ont une fonction suppressive similaire aux nTregs (Kretschmer et al., 2005).

Le phénotype des iTregs résulte de la conversion de cellules CD4⁺ FoxP3⁻ dans diverses conditions : stimulation chronique et/ou non optimale par un peptide agoniste, exposition à un agoniste administré par voie orale après transfert chez un hôte lymphopénique, ou en réponse à une infection helminthique (Finney et al., 2007; Kretschmer et al., 2005; Apostolou and von Boehmer, 2004; Grainger et al., 2010).

Les cellules Tregs FoxP3⁺ peuvent aussi être générées à partir de cellules T naïves après stimulation par le TGF-beta et l'IL-2. Comparé aux nTregs, les iTregs se sont révélées instables.

VI.3.D. Les lymphocytes T producteurs d'IL-35

Les lymphocytes T régulateurs produisant de l'IL-35 (iTr35) représentent une sous-population de Tregs induits qui possèdent des fonctions suppressives *via* l'IL-35 (Collison et al., 2010). Les cellules iTr35 constituent un médiateur de la tolérance aux agents infectieux et contribuent à la progression tumorale médiée par les cellules T régulatrices (Collison et al., 2010). Selon Ma et ses collaborateurs, des niveaux élevés d'IL-35 chez les patients atteints de cancer colorectal induit une conversion des cellules T en iTr35, en activant STAT1 et STAT3. Cette induction favorise l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T et pourrait contribuer à l'immunotolérance tumorale chez les patients atteints de cancer colorectal (Ma et al., 2016).

VI.3.E. Les cellules T régulatrices de type 1

Les cellules T régulatrices de type 1 (Tr1) sont des lymphocytes T CD4⁺ qui expriment CD25 et non FoxP3. Ces cellules sécrètent l'IL-10 et peuvent supprimer les fonctions effectrices des cellules T (Pot et al., 2011).

Comme les cellules nTregs, les cellules Tr1 jouent également un rôle important dans le contrôle de l'inflammation allergique, et ce de plusieurs façons. Ce sous-type cellulaire réprime les cellules Th2 et les cellules effectrices de l'inflammation allergiques, telles que les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles, *via* la production de l'IL-10 et potentiellement de TGF-beta (Wu et al., 2007).

D'après Yao et ses collaborateurs, les cellules Tr1 possèdent une fonction suppressive de la protéine NLRP3 (NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3), impliquée dans l'activation de l'inflammasome. Ils démontrent que ce mécanisme est dépendant de l'IL-10 (Yao et al., 2015).

Récemment, Brockmann et al ont découvert que l'expression du récepteur de l'IL-10 est essentielle pour la fonction des cellules T régulatrices Tr1 *in vivo*. Ces données suggèrent que l'expression du récepteur à l'IL-10 doit être prise en compte pour l'élaboration de thérapies cellulaires basées sur les Tr1 (Brockmann et al., 2017).

VI.3.F. Les lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ producteurs d'IL-17

Il est rapporté que le sang périphérique humain et les tissus lymphoïdes, mais pas le thymus, contiennent un nombre significatif de lymphocytes CD4⁺ FoxP3⁺, qui expriment CCR6 (C-C chemokine receptor type 6) et ont la capacité de produire l'IL-17 lorsqu'elles sont activées. Ces cellules co-expriment les facteurs de transcription FoxP3 et ROR γ mat. Ce type de cellules Tregs inhibent fortement la prolifération des lymphocytes T effecteurs CD4⁺. Ce sous-ensemble cellulaire est différencié à partir de Tregs CD4⁺ FoxP3⁺ CCR6⁻ suite à la stimulation du récepteur des lymphocytes T et en présence d'IL-1 β , IL-2, IL-21, IL-22 et de sérum humain (Voo et al., 2009).

VI.3.G. Les lymphocytes T régulateurs CD8⁺

Un sous-ensemble de Tregs exprimant le CD8 est caractérisé par l'expression de CD25, FoxP3, et CD28. Ces Tregs présentent un phénotype de surface cellulaire unique, avec

la co-expression de marqueurs associés à l'activation et aux cellules naïves. Les Tregs CD8 produisent l'IL-10, le TNF-alpha, l'interferon-gamma et le Granzyme B. Elles peuvent être rapidement générées à partir de cellules T CD8 en présence d'IL-4 et d'IL-12. Elles bloquent l'activation des lymphocytes T naïfs ou effecteurs, suppriment les réponses à anticorps IgG/IgE, et favorisent l'apparition de la maladie chronique du greffon contre l'hôte (cGVHD) *in vivo*. La suppression est dépendante du contact cellulaire et est médiée par une interaction directe entre deux cellules T (Noble et al., 2006).

En raison de l'expression constitutive de CD25, les Tregs CD8⁺ sont 2 à 40 fois plus sensibles à la stimulation par l'IL-2 que les cellules T effectrices CD8 *in vitro*, mais 2 à 4 fois moins que les Tregs CD4⁺. Néanmoins, une faible dose d'IL-2 permet l'activation et l'expansion accrue des Tregs CD8⁺ chez la souris et chez l'Homme. De plus amples études seraient judicieuses pour juger de la relevance clinique des cellules Tregs CD8⁺ dans les maladies auto-immunes (Churlaud et al., 2015).

Le **Tableau 8** récapitule les principales classes de Tregs, leur origine, leurs marqueurs, les molécules sécrétées et leurs rôles principaux.

Sous-types	Origine	Marqueurs spécifiques	Molécules sécrétées	Fonctions principales
nTregs	Thymus	CD4, CD25, FoxP3	IL-10, TGF- β	Inhibent la prolifération des LT, suppriment les cellules dendritiques, inhibent les cellules effectrices Th1, Th2, Th17, éliminent la production des IgE spécifiques des allergènes, induisent la sécrétion d'IgG4, suppriment les mastocytes, basophiles et éosinophiles, interagissent avec les cellules résidentes tissulaires et participent au remodelage tissulaire
Tregs ICOS⁺	Générés à partir des nTregs	CD4, CD25, FoxP3, ICOS	IL-10, IL-17, IFN- γ	Suppriment les cellules CD8 ⁺ qui reconnaissent l'haptène
iTregs	Périphérie	CD4, FoxP3	IL-10, TGF- β	Similaires aux nTregs
iTr35	Périphérie	CD4	IL-35	Inhibent la prolifération des lymphocytes T effecteurs, participent à l'immunotolérance tumorale
Tr1	Générées à partir de cellules progénitrices non Tregs et les ganglions lymphatiques Différenciés à partir de Tregs	CD4, CD25	IL-10	Inhibent les fonctions et la migration des cellules effectrices Th, suppriment les mastocytes, basophiles et éosinophiles
Tregs FoxP3⁺ producteurs d'IL-17	CD4 ⁺ FoxP3 ⁺ CCR6 ⁻ dans le sang périphérique et des tissus lymphoïdes	CD4, FoxP3, CCR6, RORgammat	IL-17	Inhibent la prolifération des cellules T effectrices CD4 ⁺ ,
Tregs CD8⁺	Générés à partir de cellules CD8 OT-1 et des amygdales	CD8, FoxP3, CD25, CD28	IL-10, TNF- α , IFN- γ , Granzyme B	Bloquent l'activation des cellules T naïves et effectrices, suppriment les réponses des anticorps IgG/IgE, inhibent l'expression de l'IL-4 et la prolifération des cellules T CD4 ⁺

Tableau 8 : Différentes sous-populations de Tregs humains.

iTr35 : Lymphocytes T producteurs d'IL-35 induits ; iTregs : cellules T régulatrices induites ; LT : Lymphocyte T ; nTregs : cellules T régulatrices naturelles ; Th : Cellule T helper ; Tregs : Lymphocytes T régulateurs.
D'après (Zhang et al., 2014).

VIII / Pathologies associées aux Bregs

L'importance des Bregs humains dans le maintien de l'homéostasie immunitaire provient d'une variété de pathologies liées à l'immunité, telles que les maladies auto-immunes, les cancers et les infections chroniques qui sont souvent associées à des anomalies dans le nombre ou la fonction des Bregs. Dans ce paragraphe, nous traiterons des principales pathologies associées aux lymphocytes B régulateurs : les maladies auto-immunes et inflammatoires associées à un déficit en Bregs, ainsi que les cancers et les maladies infectieuses, présentant au contraire un nombre de Bregs anormalement élevé.

VII.1. Maladies auto-immunes et inflammatoires

Les Bregs semblent jouer un rôle de modérateur dans les maladies avec dérégulation immunitaire. Même si elles ne sont pas impliquées dans ces pathologies de manière causale, elles peuvent favoriser la guérison des patients atteints de maladies allergiques. La manipulation des fonctions des Bregs pourrait être une stratégie thérapeutique intéressante pour soigner de telles pathologies.

VII.1.A. Le Lupus Erythémateux Disséminé

Le Lupus Erythémateux Disséminé (LED) est une maladie auto-immune inflammatoire multi-systémique et hétérogène qui affecte majoritairement les femmes. Au plan biologique, elle est caractérisée par la production d'anticorps antinucléaires, des anomalies de fonction des cellules B et T. Cette maladie peut affecter n'importe quel organe ou tissu. L'atteinte rénale représente la complication la plus sévère (La Paglia et al., 2017, revue).

Blair et al ont montré que les cellules B régulatrices CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} isolées du sang périphérique de patients atteints de SLE présentent des anomalies fonctionnelles. Ces cellules ne répondent pas à la stimulation par CD40, produisent moins d'IL-10 et sont dépourvues de capacités suppressives, comparé aux cellules B CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} issues d'individus en bonne santé. La fonction régulatrice altérée des cellules B peut avoir une incidence considérable sur les réponses immunitaires effectives dans le SLE et dans d'autres troubles immuns (Blair et al., 2010). La diminution de la production de l'IL-10 pourrait

résulter de la forte stimulation des Bregs en réponse à l'excès de signaux inflammatoires, entraînant l'épuisement et la perte de la fonction suppressive (Mauri and Bosma, 2012).

L'étude du rôle des Bregs chez les patients atteints de LED traités par le rituximab anti-CD20 (déplétion des cellules B) a fourni des données informatives quant à la contribution des Bregs dans le maintien de la tolérance. Les réponses des lymphocytes B et la fréquence des cellules iNKT (NKT invariant) sont altérées chez les patients atteints de LED (Bosma et al., 2012). Le défaut de stimulation des iNKT médié par les cellules B est associé à une altération de l'expression du marqueur CD1d. Les auteurs ont montré que le nombre et la fonction des iNKT ont été restaurés chez les patients atteints de LED répondant au traitement ciblant le CD20. Ils ont également constaté une normalisation de l'expression de CD1d, exclusivement dans les cellules B immatures nouvellement générées. Ces paramètres sont associés à l'amélioration de la réponse clinique chez ces patients. Cette étude révèle que les cellules B nouvellement formées ayant acquis la capacité de différenciation en Bregs peuvent conditionner les réponses d'autres cellules immunorégulatrices (Bosma et al., 2012)..

Menon et ses collaborateurs ont montré que l'expansion altérée des cellules B CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} est médiée par les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé. Ce dysfonctionnement est associé à une altération de l'activation de STAT1 et de STAT3. Selon les auteurs, la dysfonction des Bregs, STAT1 et STAT3 contribuent à la pathogenèse du LED (Menon et al., 2016).

Chez les patients atteints de LED, Gao et ses collaborateurs ont découvert que les iBregs sont moins efficaces dans le contrôle de la prolifération des lymphocytes T helper. Ils démontrent ainsi que le répertoire des lymphocytes B est amoindri dans le LED. Les anomalies des cellules iBregs chez les patients atteints de LED pourrait permettre une sur-stimulation des réponses immunitaires, et contribuer à l'initiation ou/et à la perpétuation de la maladie (Gao et al., 2014). Selon Deng et Galipeau, la reprogrammation des cellules B en cellules B régulatrices induites pourrait constituer de bons outils thérapeutiques pour le traitement de maladies auto-immunes (Deng and Galipeau, 2012).

VII.1.B. La Polyarthrite Rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PR) se caractérise par une inflammation chronique de la membrane synoviale, entraînant une prolifération synoviale, une lésion des cartilages et une

érosion osseuse, accompagnée d'une éventuelle destruction des articulations. Cette maladie est caractérisée par l'interaction entre les synoviocytes fibroblastiques (d'origine mésenchymateuse) et les cellules du système immunitaire inné (macrophages, cellules dendritiques, cellules NK...) et adaptatif (lymphocytes B et T) (Angelotti et al., 2017, revue).

Flores-Borja et son équipe ont identifié que les cellules Bregs immatures CD24^{High} CD38^{High} issues de patients atteints de PR ne possèdent pas la capacité de supprimer la différenciation des cellules Th17, ni de convertir les cellules T naïves en cellules T régulatrices fonctionnelles, comparé aux individus sains. Le nombre absolu de cellules Bregs CD24^{High} CD38^{High} est significativement diminué chez les patients atteints de LED. Les auteurs ont montré que ce nombre est négativement corrélé avec la gravité de la maladie (Flores-Borja et al., 2013). D'autres études ont confirmé ces données (Daïen et al., 2014; Ma et al., 2014; Cui et al., 2015).

Selon Hu et son équipe, les cellules régulatrices B10 issues de patients atteints de PR possèdent le potentiel de conversion en cellules productrices de RANKL (Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand). Ce potentiel de conversion exacerbe la formation d'ostéoclastes, la destruction osseuse et la progression de la maladie (Hu et al., 2017).

Bankó et ses collaborateurs ont identifié que les patients atteints de PR présentent un nombre significativement diminué de cellules Bregs CD19⁺ CD27⁺ produisant de l'IL-10, comparé aux individus sains. Ces cellules n'ont pas la capacité de supprimer la production d'IFN- γ sécrété par les lymphocytes T CD4⁺ lorsqu'ils sont co-incubés en leur présence. Le suivi de la phosphorylation des molécules clés de la signalisation révèle que l'activation de ERK, p38 et CREB est indispensable pour l'induction et la production de l'IL-10, alors que la phosphorylation de STAT3 augmente davantage l'expression de l'IL-10 dans les cellules Bregs humaines. CREB et STAT3 sont les principaux facteurs de transcription responsables de la différenciation et de l'expansion des Bregs humaines productrices d'IL-10 (Bankó et al., 2017).

VII.1.C. La Sclérose En Plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune chronique du système nerveux central (SNC). La SEP attaque les axones myélinisés dans le SNC, détruisant la myéline à des degrés divers. Cette pathologie est l'une des principales causes d'incapacité

neurologique d'origine non traumatique chez les jeunes adultes, et touche deux fois plus les femmes que les hommes (Goldenberg, 2012, revue).

La première étude décrivant la production d'IL-10 par des cellules B issues de sang de patients atteints de sclérose en plaques a été publiée en 2007. Duddy *et al* ont identifié que l'IL-10 sécrétée par les cellules B est significativement diminuée chez les patients atteints de SEP récurrente-rémittente et progressive secondaire, comparé aux individus sains (Duddy *et al.*, 2007).

Récemment, Giacomini *et al* ont montré que le prétraitement des PBMCs issus de patients atteints de SEP récurrente induit un état anti-inflammatoire dans les cellules cultivées (Giacomini *et al.*, 2017). Ce prétraitement permet la réduction de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-6, IL-8, et IL-1 β tout en augmentant significativement les interleukines régulatrices IL-10 et IL-35. Cela a également conduit à une expansion de cellules B régulatrices CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High}, ayant la capacité d'inhiber la production d'IFN- γ et d'IL-17 (Giacomini *et al.*, 2017).

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) chez la souris est une maladie auto-immune du SNC médiée par Th1, induite par immunisation avec des protéines ou des peptides de myéline (Williams *et al.*, 1994). L'EAE représente un modèle pour la sclérose en plaques, qui est caractérisée par une inflammation aiguë du CNS, la démyélinisation et la paralysie. Le rôle régulateur des lymphocytes B dans la SEP a été décrit en 1996 par Wolf et ses collaborateurs (Wolf *et al.*, 1996b).

Shen et ses collaborateurs ont montré que les souris dépourvues d'IL-35 par un double knock-out (KO) possèdent une immunité accrue, caractérisée par une activation plus élevée des macrophages et des lymphocytes T inflammatoires, et une fonction stimulatrice améliorée des cellules B à présenter les antigènes (Shen *et al.*, 2014). Ces souris déficientes en cellules B productrices d'IL-35 développent des EAE exacerbées et sont protégées de la septicémie induite par *S. Typhimurium* (*Salmonella*), par rapport aux animaux témoins. Ces données expliquent en grande partie l'amélioration de présentation des antigènes par les cellules B déficientes en IL-35. Ce potentiel est associé à une plus forte expression de CMHII, CD80, CD86, contribuant à la stimulation de la prolifération et à la production de cytokines inflammatoires par les cellules T CD4⁺ autologues. Les lymphocytes B producteurs d'IL-35

constituent des éléments clés de l'immunité durant les maladies auto-immunes et infectieuses (Shen et al., 2014).

Le potentiel de régulation de l'IL-35 dérivé des cellules B a été confirmé et complété par une étude de Wang RX et *al*, qui ont montré que le traitement par de l'IL-35 recombinant induit des Bregs sécrétant de l'IL-10, qui peuvent supprimer efficacement la prolifération des cellules B CD19⁺ (Wang et al., 2014a). L'IL-35 médie également la conversion des cellules B en une population de cellules Bregs qui sécrètent l'IL-35 (Bregs IL-35⁺). L'administration d'IL-35 recombinant ou de Bregs sécrétant l'IL-35 contrôle efficacement les étapes initiales et établies de l'Uvéite Auto-immune Expérimentale (EAU). Les EAU ont été établies grâce à des immunisations comportant plusieurs peptides. Cette protection médiée par les cellules Bregs IL-35⁺ est dépendante de l'augmentation de l'induction et de l'expansion des Bregs, des Tregs Foxp3⁺, et de l'inhibition des cellules effectrices pathogènes Th1 et Th17. Les auteurs suggèrent que l'IL-35 pourrait être utilisé pour induire des cellules Bregs autologues et des Bregs producteurs d'IL-35 pour le traitement de maladies auto-immunes et infectieuses (Wang et al., 2014a).

VII.1.D. La maladie Inflammatoire de l'Intestin

La maladie inflammatoire de l'intestin (MII) est une maladie inflammatoire intestinale chronique classée en deux formes principales : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique (RCH), autrement appelée colite ulcéreuse (CU). Ces pathologies sont médiées par des mécanismes à la fois communs et distincts, avec des caractéristiques cliniques différentes (Talley et al., 2011; Kaser et al., 2010).

Les études des Bregs chez les patients atteints de MII sont limitées par rapport à celles des patients atteints de LED, PR et SEP. Selon Oka et ses collaborateurs, la production de l'IL-10 est fortement diminuée pour les cellules issues de sujets atteints de la maladie de Crohn et de la CU lorsqu'elles sont incubées durant 72h avec du CpG, par rapport aux cellules issues d'individus témoins (Oka et al., 2014).

Des travaux menés par Ansary et *al* ont mis en évidence que les cellules apoptotiques permettent l'amélioration de la MII, en restaurant les fonctions des cellules B régulatrices, et en augmentant la production de l'IL-10 (Ansary et al., 2014).

VII.1.E. Le diabète insulino-dépendant

Le diabète insulino-dépendant (DID), ou diabète de type 1, est une maladie auto-immune dans laquelle les cellules β productrices d'insuline dans les îlots pancréatiques sont rapidement détruites par une réponse immunitaire. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ reconnaissent les auto-antigènes des îlots, entraînant ainsi une hypoglycémie qui peut être suivie de complications (Roep, 1996; Eisenbarth, 1986).

Il existe très peu d'études concernant les Bregs chez les patients atteints de DID. Selon Thompson et al, aucune différence n'est observée entre la fréquence des cellules B produisant de l'IL-10 dans le sang périphérique de patients atteints par cette pathologie et celle des individus témoins lorsque les cellules sont incubées avec de l'IL-21 durant 72h avec addition de CpG, LPS et PI (Thompson et al., 2014).

A contrario, Kleffel et son équipe ont rapporté que les cellules issues de patients atteints de diabète de type 1 présentent une diminution de la fréquence de cellules B IL-10⁺ par rapport aux cellules d'individus en bonne santé lorsqu'elles sont cultivées avec du LPS et du CpG durant 96h. Ces données suggèrent que les Bregs ayant été maturés par les antigènes peuvent maintenir la tolérance aux auto-antigènes des îlots en supprimant sélectivement les réponses des cellules T auto-réactives. Les individus atteints de DID sont dépourvus de cette population de Bregs (Kleffel et al., 2015).

VII.1.F. Le pemphigus

Le pemphigus est une maladie auto-immune spécifique de l'organe, médiée par des auto-anticorps IgG à la desmogléine 1 et/ou à la desmogléine 3. Ces auto-anticorps bloquent l'adhérence des kératinocytes, entraînant la formation de cloques intra-épidermiques des membranes de la muqueuse et de la peau (Amagai, 1996; Stanley, 1995).

Zhu et al ont montré que la fréquence des cellules Bregs immatures est augmentée dans le sang périphérique des patients atteints de pemphigus. Toutefois, ces Bregs ont une capacité amoindrie à produire de l'IL-10 après 48h de stimulation au CpG, LPS et CD40L, par rapport à celles d'individus sains (Zhu et al., 2015).

Colliou et ses collaborateurs ont découvert que les patients atteints de pemphigus étant en rémission complète après un traitement par le rituximab possèdent des fréquences plus élevées en Bregs immatures et en cellules B productrices d'IL-10, par rapport aux patients non traités ou en rémission incomplète après le traitement (Colliou et al., 2013). Ainsi, la

fonction régulatrice des cellules B peut être altérée chez les sujets atteints de pemphigus. La restauration de cellules B fonctionnelles après l'appauvrissement des lymphocytes B peut contribuer à la rémission de la maladie (Colliou et al., 2013).

VII.1.G. Les maladies allergiques

Les maladies allergiques comprennent de nombreuses pathologies hétérogènes, avec des manifestations cliniques distinctes. Ces pathologies résultent généralement d'une réponse inflammatoire non contrôlée aux allergènes. Elles peuvent conduire à un certain nombre de troubles tels que l'asthme, la rhinite allergique et la dermatite atopique. Les mécanismes favorisant l'inflammation allergique sont caractérisés par une réponse immunitaire polarisée par Th2. L'une des causes importantes du développement de l'inflammation allergique est l'altération des processus de régulation immunitaire (Soyer et al., 2013).

Van der Vlugt et ses collaborateurs ont étudié la fréquence et la fonction des cellules B régulatrices productrices d'IL-10 chez des patients souffrant d'asthme. Ils ont identifié que les sujets asthmatiques produisent moins de cellules B CD24^{High} CD27⁺ sécrétant de l'IL-10, par rapport aux individus sains lorsque les lymphocytes B sont cultivés avec du LPS durant 48h (van der Vlugt et al., 2014a).

L'équipe de Kamekura a également montré une diminution de la fréquence des cellules B CD24^{High} CD27⁺ chez des patients atteints de rhinite allergique (Kamekura et al., 2015).

VII.1.H. La maladie chronique du greffon contre l'hôte

La maladie du greffon contre l'hôte (GvH) est une pathologie chronique inflammatoire consécutive à une transplantation. Il s'agit d'une réaction des cellules immunocompétentes du donneur contre les tissus de l'hôte. Les lymphocytes T activés du donneur attaquent les cellules épithéliales du receveur suite à une inflammation causée par la greffe. Cette maladie affecte le plus fréquemment la peau, la muqueuse buccale, le foie, les yeux et le tractus gastro-intestinal (Presland, 2016, revue).

Des études menées à partir de patients atteints de GvH chronique ont mis en évidence le rôle des Bregs immatures dans l'établissement de la tolérance aux transplantations, en réprimant les réponses des cellules T effectrices (Khoder et al., 2014; Nouël et al., 2014).

Selon De Masson et son équipe, les receveurs de greffe allogéniques sont dans l'incapacité de reconstituer le pool de cellules B mémoires. Ils ont montré que les patients atteints de la

maladie chronique du greffon contre l'hôte possèdent moins de cellules B CD24^{High} CD27⁺ et de lymphocytes B CD24^{High} CD27⁺ producteurs d'IL-10, comparé aux individus sains. Les patients atteints de cGVHD ont des fréquences plasmatiques accrues mais un nombre de plasmablastes producteurs d'IL-10 diminué. Ces données suggèrent un rôle des lymphocytes B CD24^{High} CD27⁺ et de l'IL-10 dérivée des plasmablastes, dans la régulation de la GvH chronique chez l'Homme (de Masson et al., 2015).

Selon Sarvaria et al, le sang de cordon ombilical est enrichi en cellules B régulatrices productrices d'IL-10, qui peuvent être un facteur protecteur contre la GvH chronique après une transplantation de sang de cordon (Sarvaria et al., 2016).

VII.2. Cancers

Compte-tenu du rôle favorisant les tumeurs des cellules B et les capacités régulatrices des Bregs, des études récentes ont porté sur le rôle des Bregs dans le cancer.

Selon Schwartz et al, ces mécanismes comprennent l'acquisition de l'expression de ligands inhibiteurs, la phosphorylation de STAT3, et l'induction des molécules immunosuppressives IL-10 et TGF- β . Ces caractéristiques confèrent aux cellules B un phénotype de Breg. L'activité suppressive peut affecter divers sous-types cellulaires, comprenant les cellules T effectrices, les cellules NK, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC : Myeloid-Derived Suppressive Cell), et/ou des macrophages associés aux tumeurs. Les cellules B peuvent également favoriser directement la tumorigenèse, par le recrutement de cellules inflammatoires et la régulation positive de gènes pro-angiogéniques et de collagénases pro-métastatiques. L'infiltration des Bregs a été identifiée dans diverses tumeurs solides, y compris les cancers (dont la liste n'est pas exhaustive) du poumon, des ovaires, de l'estomac, du pancréas, de l'œsophage, de la tête et du cou, et du foie. Plusieurs études suggèrent que le recrutement des cellules B et l'acquisition d'une activité suppressive au sein de la tumeur peuvent constituer un mécanisme important par lequel les cellules B peuvent moduler l'immunité anti-tumorale innée et/ou adaptative. L'appauvrissement des cellules B au niveau clinique en utilisant des anticorps anti-CD20, et/ou des inhibiteurs de BTK (Tyrosine Kinase Bruton) et/ou d'autres voies de signalisation peuvent être une stratégie intéressante pour augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale (Schwartz et al., 2016, revue).

He et al ont identifié les nombreux rôles des Bregs dans l'émergence et le développement de cancers. Les Bregs peuvent inhiber d'autres cellules immunitaires par la

sécrétion de cytokines et la présentation des antigènes, ce qui leur confère leur pouvoir pathogène dans les cancers et maladies auto-immunes. Certaines sous-populations de Bregs sont capables de différencier les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ en lymphocytes T régulateurs, pouvant également être impliqués dans la cancérogénèse (He et al., 2014a).

Ganti et *al* ont mené une étude sur un modèle murin de mélanome et ont démontré que les cellules B régulatrices s'accumulent préférentiellement dans les ganglions lymphatiques drainants et favorisent la croissance tumorale. Cette réponse locale peut être une étape critique dans la génération d'un environnement immunosuppresseur permettant la croissance tumorale et la génération de métastases (Ganti et al., 2015).

Guan et *al* ont montré que l'expression de PD-L1 est plus élevée sur les Bregs provenant de patients atteints de cancer du sein invasif comparé aux individus en bonne santé. La présence de PD-L1 sur les Bregs est positivement corrélée avec les cellules T régulatrices, et négativement avec les cellules T effectrices PD-1^{High} (Guan et al., 2016b).

Un effort continu visant à comprendre la biologie des Bregs chez des individus en bonne santé apportera de nouvelles possibilités de développer des immunothérapies ciblant les Bregs. Cette stratégie pourrait s'avérer bénéfique dans le traitement de diverses pathologies liées à l'immunosuppression. Mauri et Menon présentent l'état actuel du rôle des Bregs dans diverses pathologies, ainsi que les traitements thérapeutiques actuels proposés pour y remédier (Mauri and Menon, 2017, revue).

VII.3. Maladies infectieuses

Bien que les cellules B régulatrices fournissent des avantages pour l'hôte dans les maladies auto-immunes et les maladies inflammatoires chroniques, leur présence durant une infection peut compromettre l'élimination des agents pathogènes. Un large champ de pathogènes, incluant les helminthes, les protozoaires, les bactéries et les virus est connu pour induire différentes sous-populations de Bregs chez l'Homme. Ce paragraphe tache de faire l'état de l'implication des Bregs dans diverses pathologies infectieuses.

VII.3.A. Par les helminthes

Les infections causées par les helminthes induisent de fortes réponses de type Th2 et la production d'IgE. Selon Fallon et Mangan, l'incidence des troubles allergiques est plus faible chez les personnes infectées par les helminthes que chez les personnes non infectées. Ces parasites utilisent des mécanismes spécifiques pour réguler négativement les réponses immunitaires protectrices, afin d'infecter l'hôte et de pouvoir persister en lui de manière durable. Plusieurs études rapportent que l'induction des réponses cellulaires des Bregs sur l'infection parasitaire est associée à la diminution des symptômes dans divers modèles de l'inflammation, y compris l'inflammation allergique des voies aériennes et l'anaphylaxie (réaction allergique aigüe). L'infection par les helminthes conduit à l'induction de cellules B productrices d'IL-10 et de TGF- β , qui à leur tour atténuent les réponses inflammatoires, entraînant une inhibition de l'inflammation allergique et des réponses immunitaires antiparasitaires altérées (Fallon and Mangan, 2007, revue).

Correale et Farez ont montré que les patients atteints par la sclérose en plaques infectés par les helminthes possèdent une survie globale amoindrie, comparé aux sujets atteints de SEP non infectés par ce parasite. Ils démontrent que la production d'IL-10 et de TGF- β des cellules B issues des individus infectés est significativement augmentée. Au contraire, la sécrétion d'IL-12 et le nombre de cellules produisant de l'IFN- γ sont diminués par rapport aux témoins. Ces changements de production cytokinique sont corrélés à une augmentation de la fréquence des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ chez les patients infectés (Correale and Farez, 2007). Correale et son équipe ont montré dans une autre étude que la production exacerbée d'IL-10 dérivée des cellules B régulatrices et des facteurs neurotrophiques fait partie de la régulation du parasite par le système immunitaire de l'hôte (Correale et al., 2008). La stimulation de TLR2 par les molécules helminthiques est importante pour exercer les effets régulateurs des cellules B (Correale and Farez, 2009).

VII.3.B. Par les protozoaires

Toxoplasma gondii est un parasite protozoaire qui infecte les humains et les animaux par des voies congénitales ou postnatales. Jeong et son équipe ont montré que *T. gondii* peut induire les cellules B régulatrices, incluant les Bregs CD1^{High} CD5⁺, ainsi que les Tregs CD4⁺ CD25^{High} FoxP3^{High}. L'induction des Bregs et des Tregs pendant l'infection par ce parasite est

nécessaire à l'évasion au système immunitaire de l'hôte. En tant que cellules suppressives, les Bregs pourraient supprimer l'inflammation allergique (Jeong et al., 2014).

Jeong et al ont par ailleurs démontré que les produits sécrétés au stade de la lyse cellulaire par des tachyzoïtes entièrement répliqués induisent la différenciation des cellules B naïves en Bregs productrices d'IL-10. Les auteurs ont identifié que la régulation négative de la réponse immunitaire *via* les Bregs durant l'infection par *T. gondii* est liée à la formation de kystes dans le cerveau de l'hôte et à l'établissement d'une infection chronique (Jeong et al., 2016).

VII.3.C. Par les bactéries

Díaz-Alderete et ses collaborateurs ont montré que la production de l'IL-10 est étroitement liée à l'expression de CD154 (CD40L) sur les cellules B, suggérant l'importance de l'activation cellulaire pour la production de l'IL-10. Le nombre de cellules B CD154⁺ produisant de l'IL-10 est augmenté de manière aberrante lorsque les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMCs) des patients atteints de SLE sont stimulées avec *Staphylococcus aureus* Cowan 1 (SAC) (Díaz-Alderete et al., 2004).

Un certain nombre d'études montre que les cellules plasmiques peuvent produire des cytokines et contrôler le développement de maladies infectieuses *in vivo*. L'infection par *Salmonella typhimurium* favorise la génération de cellules plasmiques CD138⁺ IL-10⁺, ce qui entrave une réponse antibactérienne efficace par l'hôte, médiée par l'action combinée des neutrophiles, des cellules NK et des lymphocytes T effecteurs. Cette action suppressive est menée par la signalisation de la protéine adaptatrice Myd88 des cellules B infectées (Neves et al., 2010).

Les cellules plasmiques CD138^{High} sont connues pour être la principale source des cytokines IL-10 et IL-35 dérivant des cellules B dans un modèle d'infection par *Salmonella enterica*, ainsi que dans un modèle d'EAE (Shen et al., 2014).

VII.3.D. Par les virus

Les cellules B régulatrices peuvent jouer un rôle préjudiciable dans le développement des réponses immunitaires antivirales.

Das et ses collaborateurs ont observé une corrélation positive entre la charge virale et les taux sériques d'IL-10 chez les patients atteints d'une infection chronique par le virus de l'Hépatite B (HBV). Une corrélation similaire a été établie entre la fréquence des cellules B circulantes

produisant de l'IL-10, qui étaient principalement des Bregs immatures CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} et la charge virale. Les cellules CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High} purifiées suppriment les réponses médiées par les lymphocytes T CD8⁺, processus dépendant de l'IL-10. Ces résultats suggèrent que les Bregs peuvent nuire aux réponses T antivirales, *via* l'action de molécules immunosuppressives (Das et al., 2012). Gong et ses collaborateurs ont démontré que la prévalence des Bregs et Tregs, ainsi que la concentration sérique en IL-10 est significativement augmentée chez les patients atteints d'infection chronique par l'HBV, comparé aux individus sains. Ils révèlent également une diminution des réponses Th1, qui est négativement corrélée avec la prévalence des Bregs. De plus, la déplétion en Tregs parmi les PMBCs des patients atteints par le HBV n'altère pas la fréquence des Bregs ni leur capacité à produire l'IL-10, indiquant le faible impact des cellules Tregs sur la génération et la maintenance des cellules B régulatrices. D'après Gong et son équipe, l'augmentation du nombre de Bregs pourrait être une source majeure d'IL-10 lors de l'infection par le virus de l'Hépatite B, et représenter un mécanisme de suppression critique dans l'altération de l'immunité anti-HBV, contribuant ainsi à la pathogénèse de ce virus (Gong et al., 2015). D'après Liu et *al*, une fréquence élevée de cellules B productrices d'IL-10 est associée à la néphropathie membranaire chez les patients atteints de HBV. Les cellules B IL-10⁺ peuvent ainsi participer à la pathogénèse de la néphropathie membranaire associée à l'HBV (Liu et al., 2016b).

Une étude indique que l'augmentation des cellules B et T régulatrices contribue à la persistance du virus de l'Hépatite C (HCV), ainsi que d'autres infections virales (Eiza et al., 2016).

Siewe et *al* ont découvert que la fréquence des cellules B régulatrices est corrélée avec les marqueurs de la progression de la maladie du SIDA, et peuvent atténuer la fonction des lymphocytes T CD8⁺ anti-VIH *in vitro*. Ils révèlent que les Bregs peuvent jouer un rôle par l'intermédiaire de l'IL-10, et possiblement PD-L1. Selon les auteurs, les Bregs contribuent au dysfonctionnement du système immunitaire chez les patients atteints par le virus du SIDA (Siewe et al., 2013). Dans une autre de leurs études, Siewe et ses collaborateurs ont montré que le blocage de l'IL-10R et de PD-1 reverse partiellement l'inhibition de la prolifération des cellules T CD4⁺ médiée par les Bregs. L'IL-10 et PD-L1 agiraient de manière synergique pour inhiber la fonction de présentation d'antigène et la prolifération des cellules T CD4⁺,

entraînant une atténuation des lymphocytes T cytotoxiques anti-VIH, et entravant l'éradication virale chez les patients atteints du SIDA (Siewe et al., 2014).

Un grand nombre de cellules GrB+ circulantes ont été décrites dans le sang de patients atteints du virus du SIDA, alors que ce sous-ensemble est négligeable chez les individus en bonne santé (Jahrsdörfer et al., 2013). Kotb et *al* concluent que le nombre élevé de cellules GrB+ dans l'infection par le VIH est corrélé avec la charge virale et au faible taux de lymphocytes T CD4+ (Kotb et al., 2017). Tabanelli et *al* ont révélé l'existence d'un patient atteint de DLBCL associé à l'EBV, corrélé avec une infection par le VIH qui possède des cellules B régulatrices GrB+. Ils démontrent une expression aberrante de marqueurs cytotoxiques chez ce sujet, et proposent que les Bregs cytotoxiques pourraient avoir une implication dans ce type de tumeurs (Tabanelli et al., 2017).

Récemment, Zhivaki et ses collaborateurs ont montré que le virus respiratoire syncitial (VRS) infecte les cellules B régulatrices des nouveau-nés chez l'Homme par le récepteur de la chimiokine CX3CR1, ce qui favorise la gravité de la maladie pulmonaire. De plus, la fréquence des cellules Bregs est corrélée positivement avec la charge virale et négativement avec la fréquence des cellules Th1 mémoires dans le sang de patients atteints de VRS. D'après les auteurs, la fréquence des cellules Bregs chez les nouveau-nés est prédictive de la gravité de la bronchiolite aiguë, et l'activité des Bregs peut constituer une réponse précoce de l'hôte favorisant la pathogenèse microbienne (Zhivaki et al., 2017).

Chapitre II : Objectifs de la thèse

L'EBV est associé à de nombreuses pathologies. Il est essentiel d'étudier la physiopathologie du virus d'Epstein-Barr en phase de latence III, afin de pouvoir mieux contrôler les lymphoproliférations liées à ce virus.

Le programme de latence III comprend toutes les protéines de latence, lesquelles sont fortement immunogènes. De par cette immunogénécité, les personnes en bonne santé sont capables d'éliminer la très grande majorité des cellules infectées et d'empêcher leur prolifération, par le biais de divers acteurs de l'immunité innée et adaptative (cellules NK, monocytes, lymphocytes T cytotoxiques et helpers). L'EBV parvient toujours au compartiment B mémoire, où un équilibre entre l'hôte et le virus s'établit. En cas de déficit immunitaire acquis, tels qu'une infection par le virus du SIDA ou suite à une transplantation, il y a rupture de cet équilibre hôte/virus et réactivation du virus. Les sujets immunodéprimés ne sont pas en mesure de supprimer ces cellules en latence III, ce qui peut aboutir à des proliférations non contrôlées, et possiblement à l'émergence de cancers.

Le laboratoire UMR 7276 CRIBL travaille depuis des années sur le virus d'Epstein-Barr, la réponse immune B et les lymphoproliférations. Plusieurs de leurs travaux ont porté sur le programme de latence III. Durand-Panteix *et al* ont démontré que les cellules en latence III surexpriment à leur surface B7-H1 (PD-L1/CD274) (Durand-Panteix *et al.*, 2012). D'autres éléments de la littérature ont permis d'identifier que l'interleukine 10 (IL-10), une cytokine aux propriétés immunosuppressives, est sécrétée par les cellules en programme de latence III, par le biais des EBERs (Samanta and Takada, 2010; Iwakiri, 2014), de LMP1 (Hatton *et al.*, 2012; Lambert and Martinez, 2007) et de LMP2A (Incrocci *et al.*, 2013, 2017). Ces caractéristiques sont en partie similaires à celles des cellules B régulatrices (Bregs), impliquées dans différentes pathologies, y compris les maladies auto-immunes, inflammatoires, infectieuses et les cancers. Plusieurs sous-types de Bregs ont été identifiés chez l'homme. Elles sont identifiées par différents marqueurs de surface. Elles ont également la capacité de surexprimer des molécules immunosuppressives telles que l'IL-10, le TGF- β et l'IL-35. Certaines sous-populations sont en mesure de différencier les lymphocytes T du sang périphérique en lymphocytes T régulateurs (CD4⁺ CD25⁺ CD127^{-/Low} FoxP3⁺).

La question posée pour ma thèse a été de savoir si les cellules B infectées par l'EBV en latence III possèdent les caractéristiques phénotypiques, sécrétoires et fonctionnelles des cellules B régulatrices.

L'article (Partie 1 des résultats) présente l'ensemble de cette caractérisation. Nous avons montré que les cellules en latence III de l'EBV jouent le rôle des Bregs de type immature, par l'intermédiaire de l'axe PD1/PD-L1.

Dans un autre travail en cours (Partie 2 des résultats), nous avons tenté de déterminer quels étaient les mécanismes moléculaires sous-jacents à la surexpression des molécules immunosuppressives IL-10, TGF- β 1 et IL-35, caractéristiques des Bregs. Les travaux de Faumont et *al* ont permis d'identifier que les programmes de transcription majeurs détournant les cellules en programme de latence III sont NF- κ B et c-Myc (Faumont et al., 2009). Par l'intermédiaire d'inhibiteurs chimiques, nous avons inhibé ces facteurs de transcription et identifié que l'IL-10 est positivement régulée par NF- κ B et c-Myc, TGF- β 1 négativement par ces deux derniers, et l'IL-35 positivement par NF- κ B et négativement par c-Myc.

Chapitre III : Résultats

Partie 1 : Article

I/ Introduction

Les cellules en programme de latence III de l'EBV sont impliquées dans de nombreuses pathologies, tels que les désordres lymphoprolifératifs post-transplantation (PTLDs), les lymphomes primaires du Système Nerveux Central, non Hodgkiniens associés à des désordres immuns primaires, et les lymphomes d'immunodéficience iatrogènes. Plusieurs groupes se sont intéressés à la physiologie des cellules B en programme de latence III de l'EBV. Le laboratoire UMR CNRS 7276 a notamment mis en évidence que les cellules immortalisées par l'EBV en latence III surexpriment à leur surface B7-H1 (PD-L1/CD274) (Durand-Panteix et al., 2012). Il est largement décrit que l'IL-10 est sécrété par les cellules en programme de latence III de ce virus (Iwakiri, 2014), caractéristiques phares des cellules B régulatrices (Bregs).

La problématique de cet article est d'établir la relation entre les cellules en latence III de l'EBV et les Bregs, tant au niveau phénotypique et sécrétoire que fonctionnel.

Dans un premier temps, nous montrons que les cellules B immortalisées par le virus en latence III possèdent toutes les caractéristiques phénotypiques des Bregs immatures (CD24^{High} CD38^{High} PD-L1^{High}). Le test effectué avec des marqueurs de surface spécifiques des autres sous-populations de Bregs humaines (CD25, CD27, CD1d) nous a permis de discriminer les autres sous-types.

Un des autres critères principaux des Bregs est la surexpression des molécules immuno-inhibitrices IL-10, TGF- β 1 et IL-35 (composé des deux sous-unités *EBI3* et *IL12A*). Nous montrons dans cet article que toutes les lignées en programme de latence III de l'EBV surexpriment de manière significative ces molécules, tant aux niveaux transcriptionnel que sécrétoire, par rapport aux lignées non infectées ou dans un autre type de latence.

Enfin, nous nous sommes intéressés à la capacité des cellules en programme de latence III à différencier les lymphocytes T du sang périphériques en lymphocytes T régulateurs (Tregs), une des propriétés des Bregs immatures.

Nous prouvons que ce type de cellules peut induire cette différenciation *ex vivo* dans un système autologue, contrairement aux cellules des lignées non infectées ou non en latence III. Nous avons identifié que les cellules en programme de latence III sont capables d'induire la mort des cellules T CD4+, et d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4+ et CD8+ autologues.

PD-L1 étant décrite comme une molécule phare des Bregs immatures, nous montrons que l'inhibition de cette molécule immuno-inhibitrice conduit à la diminution du pourcentage de Tregs, abaissant ce pourcentage à celui obtenu avec l'incubation des lymphocytes T avec du milieu seul.

EBV proliferating B-cells phenotypically and functionally mimic immature regulatory B-cells, with contribution of PD-L1

Héloïse Auclair, Catherine Ouk-Martin, Pauline Santa, Hazar Al Mohamad, Nathalie Faumont, Jean Feuillard & and Chantal Jayat-Vignoles

Soumis à Haematologica

**EBV proliferating B-cells phenotypically and functionally mimic immature regulatory
B-cells, with contribution of PD-L1**

**Héloïse Auclair*, Catherine Ouk-Martin*, Pauline Santa*, Hazar Al Mohamad*,
Nathalie Faumont*, Jean Feuillard*& and Chantal Jayat-Vignoles***

Condensed title: EBV proliferating B-cells mimic regulatory B-cells

*Centre National de la Recherche Scientifique, UMR CNRS 7276, Faculté de Médecine,
Université de Limoges, France

&CHU Dupuytren, Laboratoire d'Hématologie, 2 Avenue Martin Luther King, 87042
Limoges Cedex, France

Corresponding author: Jean Feuillard and Chantal Jayat-Vignoles,

E-mail: jean.feueillard@unilim.fr and chantal.vignoles@unilim.fr

Tel: 33 (0) 5 19 56 42 21

Fax: 33 (0) 5 55 43 58 97

Abstract: 240 words

Text: 3695 words

Article summary:

Despite being highly immunogenic, EBV constantly succeeds in becoming silent in its ultimate resident memory B-cell compartment, which demonstrates that some EBV-latency III/proliferating B-cells can escape from the host immune system. EBV proliferating B-cells are known to express two immunosuppressive molecules, IL-10 and PD-L1, two features of regulatory B-cells (Bregs).

Our results provide mechanistic clues to the reasons why EBV proliferating B-cells are not definitively eliminated and why EBV positive diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) occur on a more fragile background such in elderly patients since, mimicking immature Bregs, with expression of CD24, CD38 and CD274/PD-L1 and secretion of high levels of the immunosuppressive cytokines IL-10, IL-35 and TGF- β 1, EBV proliferating B-cells were able to repress proliferation of pre-activated autologous T-cells and to promote autologous regulatory T-cells expansion in a PD-L1 dependent manner.

Abstract

Epstein-Barr virus (EBV) infects and immortalizes B-cells *in vitro* and *in vivo*. It is the causative agent of most immune deficiency related lymphoproliferative disorders and it is associated with various lymphomas such as Hodgkin's lymphoma, Burkitt's lymphoma, or diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) of the elderly. One characteristic of EBV proliferating B-cells (EBV latency III infected B-cells) is to secrete interleukin 10, a key property of immature regulatory B-cells (Bregs).

We found that EBV proliferating B-cells displayed an immature Breg phenotype with high levels of CD24 and CD38 expression concomitantly to increased expression of the immune regulatory CD274/PD-L1 molecule. They expressed high levels of the three Breg immunosuppressive cytokines IL-10, IL-35 and TGF- β 1 both at mRNA and secretory levels. Coculture of EBV latency III B-cells with their autologous T cells pre-activated by CD2, CD3 and CD28 led to repression of T-cell proliferation. EBV proliferating B-cells were able to promote expansion of FoxP3^{High} regulatory CD4^{pos} T-cells (Tregs) from quiescent autologous T cells. Co-incubation with antibodies against PD-L1 showed that this Treg expansion was dependant on the PD-1/PD-L1 axis.

These results provide clues to understand why (i) EBV proliferating B-cells are not definitely eliminated in most patients like other viruses responsible for chronic infection and (ii) EBV-positive DLBCL occur on a more fragile background, such as in elderly patients. Our results also raise the question whether some DLBCLs with an activated phenotype could mimic Bregs.

Introduction

The Epstein-Barr gamma-herpes virus (EBV) infects approximately 95% of the worldwide adult population. EBV is the causative agent of immune deficiency related lymphoproliferative disorders, such as post-transplant lymphoproliferative disorders (PTLDs) and AIDS-associated B-cell lymphomas (Basgoz and Preiksaitis, 1995; Ambinder, 2001). It is associated with some solid tumors, such as gastric carcinomas (GC) or nasopharyngeal carcinomas (NPC), as well as with various lymphoproliferative disorders, including Hodgkin's lymphoma (HL), Burkitt's lymphoma (BL), or diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) of the elderly. EBV has been classified as a group 1 carcinogen by the Agency for Research on Cancer (IARC).

When EBV infects B-cells, its linear double-strand DNA is circularized (EBV episome) in the nucleus of the cell, and the full range of EBV latent genes is transcribed. Subverting some key activation pathways of the cells, this latency program, called latency III or proliferation program, leads to immortalization of the infected B-cells. For example, Epstein-Barr Nuclear Antigen 2 (EBNA2), which orchestrates the latency III/proliferation program, reroutes the Notch pathway by targeting the cellular RBP-J κ DNA binding factor. The viral latent membrane proteins (LMP1 and 2A) provide constitutive survival signals that mimic those of CD40 and of the B-cell receptor (BCR) respectively (Fields et al., 2007).

Despite its B-cell immortalization capability, EBV primo-infection is spontaneously resolved, either asymptotically or after the symptomatic phase, infectious mononucleosis (IM), due to a vigorous immune response. Indeed, most latent proteins such as EBNAs are highly immunogenic. EBV proliferating B-cells are kept under the tight control of the EBV-specific

immune response, exerted mainly by cytotoxic CD8+ T and NK cells. This vigorous immune response not only results in the spontaneous resolution of EBV primary infection but also prevents initiation and progression of EBV-associated tumors. Nevertheless, the EBV episome will never be eliminated by host immune system, being hidden in the nucleus of memory B-cells, resulting in the establishment of a life-long persistent infection after clinical resolution of the primary infectious episode. Episodically, the virus latency III/proliferation program can be reactivated in the dormant infected memory B-cell and the virus can then enter the lytic cycle. It again becomes visible to the immune system of the host. Any rupture of balance between the immune system of the host and the virus may lead to development of an EBV-associated cancer.

The fact that EBV is able to reach the memory B-cell compartment of its immunocompetent host demonstrates that some EBV-proliferating B-cells can escape from the immune system of the host. This escape raises the question of the ability of EBV infected B-cells to modulate the immune response. Secretion of the immunosuppressive cytokine interleukin-10 (IL-10) by EBV infected B-cells, either *in vitro* by EBV-proliferating B-cells or *in vivo* during IM or HL has been reported many years ago (Sarris et al., 1999; Taga et al., 1995). IL-10 was first described as a major factor of human B cell activation, proliferation, and differentiation (Itoh and Hirohata, 1995). Production of large amounts of IL-10 frequently occurs in AIDS-BL (AIDS-related Burkitt's lymphoma) and correlates with EBV infection of the BL tumor clone (Fassone et al., 2000). Higher IL-10 levels have been detected in patients with EBV-positive PTLDs than in EBV-negative subjects (Muti et al., 2003b, 2005). Increased levels of this cytokine are also found in serum from patients with HL (Sarris et al., 1999), as well as in the elderly (Bernstein and Murasko, 1998).

Besides the role of IL-10 in promoting B-cell lymphomagenesis, this cytokine is a key cytokine for regulatory B-cells (Bregs), an immunosuppressive B-cell subset that supports immunological tolerance (Mauri and Menon, 2015b; Rosser and Mauri, 2015; Rincón-Arévalo et al., 2016). Bregs contribute to B-cell mediated immune suppression during various infectious diseases or in pathogenesis of autoimmune and neoplastic disorders (He et al., 2014b; Fillatreau, 2016; Ray and Dittel, 2017). The regulatory function of Bregs has been associated with the presence and activation of molecules such as CD40 and the BCR (Rincón-Arévalo et al., 2016). Breg properties are strongly related to secretion of anti-inflammatory and immunosuppressive IL-10, IL-35 and TGF- β . Multiple Breg subsets with distinct and partially overlapping characteristics have been identified in humans. It includes (CD19⁺CD24^{High}CD27^{int}) plasmablasts, (CD19⁺CD24^{High}CD27⁺) B10 cells, (CD19⁺CD24^{High}CD38^{high}) immature Bregs, (CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺) GrB⁺ Bregs and (CD73⁻CD25⁺CD71⁺) Br1 cells (Mauri and Menon, 2015b; van de Veen et al., 2016). Bregs can induce formation of CD4 positive regulatory T-cells (Tregs) and are able to inhibit proliferation of effector T-cells (Mauri and Menon, 2015b; Rosser and Mauri, 2015; Rincón-Arévalo et al., 2016). Moreover, immature Bregs overexpress immunosuppressive PD-L1/CD274.

With others, we showed that EBV-proliferating B-cells overexpressed PD-L1/CD274/B7-H1, leading to decreased autologous anti-EBV cytotoxicity (Kim et al., 2008; Durand-Panteix et al., 2012). In this study we show that immunophenotype of EBV-proliferating B-cells resembles that of immature Bregs with expression of PD-L1/CD274, CD38 and CD24 as well as secretion of IL-10, IL-35 and TGF- β 1. EBV-proliferating B-cells are able to repress proliferation of autologous effector T-cells, and can promote Treg expansion, with a major role for the PD-1/PD-L1 axis. These features demonstrate that, despite induction of a vigorous

anti-EBV immune response, EBV-proliferating B-cells, like Bregs, also have the ability to moderate the host immune response.

Materials and methods

Cell culture conditions. EBV-negative Burkitt lymphoma (BL) cell lines BL2 and BL41 and their EBV-positive counterparts, BL2B95.8 and BL41B95.8, as well as the lymphoblastoid cell lines (LCLs) RUD and PRI and the atypical BL cell line P3HR1 were cultured in RPMI 1640 medium (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% tetracycline-free decomplexed fetal calf serum (FCS; Clon- tech, Palo Alto, CA), 50 IU/mL penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 2mM L-glutamine. Amino acids, vitamins and pyruvate were added at the supplier recommended concentrations (all from Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA), at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere. Samples from healthy subjects were issued for the “Centre de Ressources Biologique” of the University Hospital Center of Limoges after their informed consent. New lymphoblastoid cell lines (C0401; J1209 and N2803) were established by Genethon (Evry, France). They were cultured in the same conditions as the other cell lines.

Flow cytometry. For surface labeling, 500,000 cells were labeled for 15 min in 50 µL PBS at room temperature in the dark. The different antibodies and conjugated fluorochromes, as well as final dilutions are listed in Table IA and IB (isotypic controls). Cells were washed in PBS and fixed in 300 µL PBS - 1% PFA. Fox-P3 labeling was performed for 45 min in the dark at room temperature after surface labeling using the Intraprep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter, Pasadena, CA) according to the protocol recommended by the supplier.

For T cell death analysis, cells were washed in PBS and labeled with CD4-FITC for 15 min in the dark at room temperature. After washing in PBS, cells were resuspended in 200 µl PBS and TOPRO-3 dye was added at 1 mM just prior to analysis.

To assay proliferation by flow cytometry, cells were incubated with Violet Proliferation Dye 450 (VPD450, BD Biosciences) for 15 min à 37°C. After two washes, cells were resuspended in culture medium in the different test conditions. After 5 days culture, cells were washed once and labeled with CD4-FITC and CD8-APC-H7 mAbs for 15 min at room temperature in the dark.

Acquisition was performed on BD Biosciences flow cytometers : a FACS Calibur for B-cells labeling and cell death, a FACS ARIA III for Treg labeling and a LSR Fortessa for proliferation. Results were analysed with the Kaluza V3.1 software (Beckman Coulter) or the Cell Quest Software (Beckton Dickinson). MFI ratios are calculated as the MFI of the marker on its isotypic control.

RNA extraction and real-time quantitative PCR. For RNA extraction, 10^6 cells were washed once and resuspended in 500 μ L Trizol (Life Technologies). Total RNA was then extracted according to the manufacturer's recommendations.

Total RNA (2 μ g) was retrotranscribed with the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster city, CA) according to the manufacturer's protocol in 20 μ L final reaction volume. The cycle of retrotranscription was : 10 min 25°C, 2h 37°C, and 5 min 85°C.

Quantitative mRNA expression of IL-10, TGF-beta 1, EBI3, IL12A and HPRT1 was performed in duplicate from 6 ng cDNA on the ABI PRISM 7000 automat using the Taqman Assay On Demand Gene Expression system (Life Technologies, Cergy-Pontoise, France,

reference Hs00961622-m1 ; Hs00820148-g1 ; Hs01057148-m1 ; Hs01073447 ; Hs02800695-m1 respectively). Each qPCR was performed in duplicate. The delta CT was calculated as the mRNA cycle threshold (CT) – the HPRT1 CT (Δ CT). The delta delta CT ($\Delta\Delta$ CT) was calculated as the delta delta CT that is the delta CT of a given mRNA – the delta CT of a pool of RNA of B cells from five normal subjects. The calculated relative mRNA expression level was equal to $2^{-\Delta\Delta$ CT.

ELISA tests. To measure cytokine secretion, cells were cultured at 0.4×10^6 cells / mL for 48h. Fifteen milliliters of supernatant was then concentrated with using the Amicon Ultracel – 10K (Millipore, Darmstadt, Deutschland) by centrifugation at 4 000 g for 30 min. ELISA tests for IL-10, TGF- β 1, IL27 and IL12 were performed in duplicate following the manufacturer’s instructions (Human IL-10, ELISA Kit with pre-coated plates, Cat #430607 ; Human latent TGF- β , ELISA kit with pre-coated plates, Cat #432907 ; Human IL-27 ELISA Kit with pre-coated plates, Cat#434607 ; Human IL-12 (p70), ELISA Kit with pre-coated plates, Cat#431707 ; Biolegend, San Diego, CA, respectively).

Negative immuno-selection of peripheral T lymphocytes. Blood samples issued from healthy donors of the “Centre de Ressources Biologiques” of the Limoges University Hospital Center, were half diluted with RPMI 1640 complemented with 10% FCS. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were recovered after separation on Lymphocyte Medium Separation (LMS) (Eurobio ; Les Ulis France). After washing in PBS, cells were resuspended in 500 μ L RPMI 1640 in which a cocktail of antibodies against all PBMC subtypes except T cells was added (Human T cell Isolation kit; Stemcell Technologies; Grenoble France), following the kit’s instruction. The purity of recovered T-cells was checked by flow cytometry.

Results

EBV proliferating B-cells display an immature Breg phenotype.

Bregs and EBV proliferating B-cells both express IL-10 and PD-L1. We thus characterized the immunophenotypes of different cell lines with regards to the Breg phenotype. Proliferating B-cell lines included 5 classical LCLs, and EBV converted Burkitt lymphoma (BL) cell lines. Among the 5 LCLs, two (PRI and RUD) have been established for more than two decades and three (C0401, J1209 and N2803) have been recently established (less than one year). As negative controls, we used the EBV-negative counterpart of EBV-converted BL cells, the P3HR1 cell line (EBNA2 negative atypical EBV latency), as well as normal freshly isolated resting B-cells (Table I). Cells were stained for CD1d, CD24, CD25, CD27, CD38 and PD-L1/CD274. The five LCLs and the two EBV-converted BL cell lines over-expressed CD24 and CD38 (Figure 1A). EBV proliferating B-cells also strongly expressed PD-L1 in comparison with controls (Figure 1B). Of note, transcriptome results suggested that PD-L1 expression during EBV latency III/proliferation program was mainly due to LMP1, the main EBV oncogene (unpublished data). By contrast, neither EBV negative cell lines, P3HR1 cells or resting B-cells expressed these three markers. Markers of Br1 (CD25), B10 and plasmablast (CD27) and GrB⁺ (CD1d) Breg subtypes were negative (Figure 1C).

We next studied expression of IL-10, TGF- β 1 and IL-35, the three Breg cardinal immunosuppressive cytokines, at the transcriptional level by RT-QPCR and at the secretory level in culture medium by ELISA. Despite variations between cell lines, all EBV proliferating B-cells (classical LCLs and EBV-converted BLs) strongly overexpressed IL-10, TGF- β 1 and the two constitutive subunits of IL-35 at both transcriptional and secretory levels (*EBI3* and *IL12A* genes, IL-27 β and IL-12 α corresponding protein subunits) (Figure 2).

Thus, based on PD-L1, CD24 and CD38 membrane expression as well as on secretion of IL-10, TGF- β 1 and IL-35, EBV proliferating B-cells displayed a phenotype evoking immature Bregs.

EBV proliferating B-cells control cell death and proliferation of their autologous T-cells

B cells activated with LPS can induce specific CD4 T-cell apoptosis due to TGF- β secretion (Tian et al., 2001). We also showed that EBV proliferating B-cells may induce CD4 T-cell death through the Fas/FasL axis (Le Clorennec et al., 2006). As shown in figure 3, we found that the three LCLs C0401, J1209 and N2803 induced some cell death of autologous CD4 but not of CD8 T-cells (Figure 3). Bregs are known to repress CD4+ and CD8+ T-cell activation and proliferation. T-cells were thus stimulated or not with a cocktail of beads coated with anti-CD2, anti-CD3 and anti-CD28 agonist mAbs (CD2/CD3/CD28 cocktail), which mimics T-cell stimulation by antigen-presenting cells (Chen and Flies, 2013), in the presence of autologous EBV proliferating B-cells at B-cell:T-cell ratios ranging from 0 to 4. As expected, the anti-CD2/CD3/CD28 cocktail strongly stimulated T cell proliferation (Figure 4). At a B-cell:T-cell ratio between 0.5 and 2, proliferation of autologous CD4 and CD8 T-cells was moderately inhibited for two of the three tested LCLs (J1209 and N2803), but with a decreased number of proliferation cycles (Figure 4). This inhibitory effect was much stronger for the third LCL C0401, likely reflecting inter individual variability (Figures 4B and 4C). At a B-cell:T-cell ratio of 4, the three LCLs almost completely blocked proliferation of their autologous CD2/CD3/CD28 activated T cells. This inhibition of proliferation was comparable for both CD4 and CD8 T-cells (Figures 4B and 4C).

Therefore, like Bregs, EBV proliferating B-cells were able to control proliferation of their autologous T-cells.

EBV proliferating B-cells promote expansion of CD4⁺ Foxp3^{High} Tregs.

One of the major immunosuppressive mechanisms of Bregs is to favour Treg expansion. Various Treg subtypes have been reported. All, except Tr1 Tregs, express increased levels of Foxp3. Tregs can be separated in two main subsets, those derived from thymic T-cells, that are CD25 positive (nTregs and their ICOS positive derivatives), and those that result from peripheral T-cell differentiation, that are CD25 negative (including iTreg and IL17 producing Treg). Co-culture of each recently established LCL and their cognate autologous T-cells for 48H induced strong Treg expansion and principally CD4⁺ FoxP3^{High} CD25⁻ expansion (Figure 5A and 5B). This Treg expansion was significantly higher than that induced by autologous supernatants (Figure 5B). Therefore, like Bregs, EBV proliferating B-cells had the ability to induce Treg expansion, due to direct autologous cell-cell contact.

Induction of Treg expansion by EBV-proliferating B-cells is under the dependence of the PD-L1/PD-1 axis.

Since EBV-proliferating B-cells over-expressed immunosuppressive PD-L1, we examined whether it could play a role in induction of Treg expansion by EBV proliferating B-cells.

We first checked PD-1 expression on T-cells. It was significantly increased after induction of proliferation by the anti-CD2/CD3/CD28 cocktail, and even more so in the presence of autologous EBV proliferating B-cells (Figure 6A and 6B). Autologous T-cells were then incubated with either culture medium, an isotypic control or a blocking anti-PD-L1 mAb, in the presence or not of their cognate EBV latency III infected B-cells. Compared to culture medium, the isotypic control did not, or only very weakly, affect Treg expansion by EBV proliferating B-cells, while Treg expansion was dramatically decreased in the presence of the

anti-PD-L1 blocking antibody, reaching levels close to those of supernatants alone (Figures 6C and 6D).

These results suggest that the PD-1/PD-L1 axis played a major role in EBV proliferating B-cell induced expansion of CD4⁺ Foxp3^{High} Tregs.

Discussion

In this study, we demonstrated that EBV proliferating B-cells exhibited immunophenotypic and functional features analogous to those of immature Bregs, with the ability to inhibit the proliferation of the autologous T-cells and to induce Treg expansion. Moreover, we show that Treg expansion by EBV proliferating B-cells was dependent on the PD-1/PD-L1 axis.

Regulatory B-cells (Bregs) were first described as a specific B-cell subset that moderates chronic inflammation in bowel disease (Mizoguchi et al., 2000). They were then described in humans, some years later (Bouaziz et al., 2008). Breg immunoregulatory properties are related to the ability to secrete immunosuppressive cytokines, mainly IL-10 (Blair et al., 2010) but also TGF- β (Lee et al., 2014b; Rosser and Mauri, 2015) and IL-35 (Wang et al., 2014b; Egwuagu and Yu, 2015). Taking into account the cytokine expression profile and the immunoregulatory functional properties, different immunophenotypic characteristics have been reported. A consensus on Breg properties and phenotype was published in 2015 (Mauri and Menon, 2015b). From this, it appeared that a common characteristic of all Breg subsets is the ability to secrete IL-10 and to repress proliferation of autologous T-cells. For example, in humans, immature Bregs have been reported to express high levels of CD38 and CD24 (Blair et al., 2010). The B10 Breg subtype was described among CD27⁺ CD24⁺ B-cells (de Masson et al., 2015). CD138 positive plasmablasts could also exhibit Breg properties. Expression of granzyme B in some B-cells or CD25 in others was associated with a Breg phenotype (GrB and Br1 Bregs) (Lindner et al., 2013). Both immature Bregs (CD24^{High} CD38^{High} cells) and iBregs (expressing IDO) have the capacity to promote Treg expansion. Expression of PD-L1 has been specifically reported for immature Bregs (Mauri and Menon, 2015b). In addition to immunophenotypic similarities with immature Bregs, EBV-proliferating infected B-cells had the ability to orient T-cell fate, inducing both T-cell proliferation and activation, as well as

Treg expansion. These Tregs are likely to differentiate from peripheral CD4⁺ T-cells, since they were CD4⁺ Foxp3^{High} CD25⁻ Tregs.

EBV proliferating B-cells are highly immunogenic (Tse and Kwong, 2015) and prone to CD95 induced apoptosis by cognate T-cells (Le Clorennec et al., 2006). In the meantime, EBV latency III immortalized B-cells express high levels of PD-L1, and PD-L1 moderates autologous cytotoxicity of CD8-cells against these EBV immortalized B-cells (Durand-Panteix et al., 2012). High levels of surface PD-L1 are very likely to be under the dependence of LMP1 (our unpublished results and (Bi et al., 2016a; Fang et al., 2014). Here, we show that induction of Tregs by EBV-proliferating B-cells is under the dependence of the PD-1/PD-L1 axis. Supernatants from all EBV-proliferating B-cell lines tested were able to induce some Treg expansion. This suggests that Treg expansion could be somehow due to a paracrine effect. But cell/cell contact was the major determinant of Treg expansion, with the involvement of the PD-1/PD-L1 axis. PD-L1 expression is deregulated in numerous cancers including EBV negative lymphomas (Gatalica et al., 2015; Xing et al., 2016). PD-L1 dysregulation may be related to structural rearrangements of chromosome 9 in diffuse B-cell non-Hodgkin lymphomas (Chong et al., 2016), a very strong genetic indication that tumor selection pressure favors transformed cells able to escape from immune surveillance. Increased PD-L1 expression is also found in EBV negative or positive Hodgkin's lymphoma (Chen et al., 2013; Paydas et al., 2015). In breast cancers, PD-L1 expression is associated with poor patient prognosis (Zhang et al., 2017a). Expression of this immune checkpoint is associated with Tregs within the tumour for breast cancers. Several studies reported that the PD-1/PD-L1 axis is implicated in the differentiation of TH1 cells into Tregs (Amarnath et al., 2011; Zitvogel and Kroemer, 2012). Presence of intratumor Tregs correlates with a poor

prognosis for breast cancer (Li et al., 2016). Immunotherapies targeting the PD-1/PD-L1 axis have proven to be effective for treatment of this cancer (Galanina et al., 2017).

Altogether, we demonstrate that EBV proliferating B-cells have major intrinsic immunosuppressive properties. Even if it has been largely demonstrated that the EBV burden is under the strict control of the host immune system, these results give clues to the reasons why EBV proliferating B-cells are not definitely eliminated as for other viruses responsible for chronic infection, such as Hepatitis B virus (Rosenberg, 1999). These results could also provide some light on the reasons why EBV positive diffuse large B-cell lymphomas (DLBCLs) occur on a more fragile background, such as in elderly patients, who are known to have an increased pool of Tregs (Chang et al., 2015) and decreased capacities to elaborate immune protection when vaccinated (Nastoupil et al., 2012). Due to continuous NF- κ B activation, either related to LMP1 expression for EBV or to mutations in the NF- κ B activating track for ABC-DLBCLs, both EBV proliferating B-cells and ABC-DLBCLs are phenotypically close. Kiyasu and collaborators showed the role of PD-L1 dysregulation in DLBCLs which is correlated with poor prognosis (Kiyasu et al., 2015). Our results raise the question whether these poor prognosis aggressive B-cell lymphomas could also mimic Bregs, modifying their immune micro-environment through, for example, secretion of immunosuppressive cytokines or promoting expansion of FoxP3^{High} Tregs.

Acknowledgements

We thank the Cytometrie et Imagerie (CIM) platform for flow cytometry. This work was supported by La ligue nationale contre le cancer (équipe labellisée Ligue) and the University of Limoges. We thank Dr. Jeanne Cook-Moreau for careful English editing.

References

1. Basgoz N, Preiksaitis JK. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect Dis Clin North Am* 1995;9(4):901–923.
2. Ambinder RF. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990 2001;37(10):1209–1216.
3. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
4. Sarris AH, Kliche KO, Pethambaram P, et al. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 1999;10(4):433–440.
5. Taga H, Taga K, Wang F, Chretien J, Tosato G. Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 1995;171(5):1347–1350.
6. Itoh K, Hirohata S. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Immunol Baltim Md* 1950 1995;154(9):4341–4350.
7. Fassone L, Gaidano G, Ariatti C, et al. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2000;38(5-6):481–488.
8. Muti G, Klersy C, Baldanti F, et al., Co-operative Study Group on PTLDs. Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 2003;122(6):927–933.

9. Muti G, Mancini V, Ravelli E, Morra E. Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* 2005;46(10):1397–1407.
10. Bernstein ED, Murasko DM. Effect of age on cytokine production in humans. *Age* 1998;21(4):137–151.
11. Mauri C, Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int Immunol* 2015;27(10):479–486.
12. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity* 2015;42(4):607–612.
13. Rincón-Arévalo H, Sanchez-Parra CC, Castaño D, Yassin L, Vásquez G. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int Rev Immunol* 2016;35(2):156–176.
14. He Y, Qian H, Liu Y, Duan L, Li Y, Shi G. The roles of regulatory B cells in cancer. *J Immunol Res* 2014;2014215471.
15. Fillatreau S. Regulatory roles of B cells in infectious diseases. *Clin Exp Rheumatol* 2016;34(4 Suppl 98):1–5.
16. Ray A, Dittel BN. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J Clin Med*;6(1):
17. Van de Veen W, Stanic B, Wirz OF, Jansen K, Globinska A, Akdis M. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J Allergy Clin Immunol* 2016;138(3):654–665.

18. Kim YS, Park GB, Lee H-K, et al. Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J Immunol Baltim Md 1950* 2008;181(9):6158–6169.
19. Durand-Panteix S, Farhat M, Youlyouz-Marfak I, et al. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J Immunol Baltim Md 1950* 2012;189(1):181–190.
20. Tian J, Zekzer D, Hanssen L, Lu Y, Olcott A, Kaufman DL. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J Immunol Baltim Md 1950* 2001;167(2):1081–1089.
21. Le Clorennec C, Youlyouz-Marfak I, Adriaenssens E, Coll J, Bornkamm GW, Feuillard J. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* 2006;107(5):2070–2078.
22. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 2013;13(4):227–242.
23. Mizoguchi E, Mizoguchi A, Preffer FI, Bhan AK. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int Immunol* 2000;12(5):597–605.
24. Bouaziz J-D, Yanaba K, Tedder TF. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol Rev* 2008;224:201–214.

25. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, et al. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* 2010;32(1):129–140.
26. Lee KM, Stott RT, Zhao G, et al. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur J Immunol* 2014;44(6):1728–1736.
27. Wang R-X, Yu C-R, Dambuza IM, et al. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat Med* 2014;20(6):633–641.
28. Egwuagu CE, Yu C-R. Interleukin 35-Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Crit Rev Immunol* 2015;35(1):49–57.
29. De Masson A, Bouaziz J-D, Le Buanec H, et al. CD24(hi)CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2015;125(11):1830–1839.
30. Lindner S, Dahlke K, Sontheimer K, et al. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res* 2013;73(8):2468–2479.
31. Tse E, Kwong Y-L. Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp Mol Med* 2015;47:e136.
32. Bi X-W, Wang H, Zhang W-W, et al. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- κ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J Hematol Oncol* *J Hematol Oncol* 2016;9(1):109.

33. Fang W, Zhang J, Hong S, et al. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget* 2014;5(23):12189–12202.
34. Gatalica Z, Bilalovic N, Vranic S, Arguello D, Reddy S, Ghosh N. PD-L1 and PD1 Expression in Lymphomas. *Blood* 2015;126(23):3899–3899.
35. Xing W, Dresser K, Zhang R, et al. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget* 2016;7(37):59976–59986.
36. Chong LC, Twa DDW, Mottok A, et al. Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 2016;128(9):1206–1213.
37. Chen BJ, Chapuy B, Ouyang J, et al. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2013;19(13):3462–3473.
38. Paydas S, Bağır E, Seydaoglu G, Ercolak V, Ergin M. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. *Ann Hematol* 2015;94(9):1545–1552.
39. Zhang M, Sun H, Zhao S, et al. Expression of PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 2017;8(19):31347–31354.
40. Amarnath S, Mangus CW, Wang JCM, et al. The PDL1-PD1 Axis Converts Human Th1 Cells Into Regulatory T Cells. *Sci Transl Med* 2011;3(111):111ra120.

41. Zitvogel L, Kroemer G. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* 2012;1(8):1223–1225.
42. Li Z, Dong P, Ren M, et al. PD-L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3+ Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J Cancer* 2016;7(7):784–793.
43. Galanina N, Kline J, Bishop MR. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Ther Adv Hematol* 2017;8(2):81–90.
44. Rosenberg W. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut* 1999;44(5):759–764.
45. Chang C, Wu S-Y, Kang Y-W, et al. High Levels of Regulatory T Cells in Blood Are a Poor Prognostic Factor in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am J Clin Pathol* 2015;144(6):935–944.
46. Nastoupil LJ, Sinha R, Flowers CR. Management Strategies for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Eur Oncol Haematol* 2012;8(2):123–126.
47. Kiyasu J, Miyoshi H, Hirata A, et al. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood* 2015;126(19):2193–2201.

Figure Legends:

Figure 1. EBV proliferating B cells possess similar antigenic determinants as immature

Bregs. Cells from each cell line and from normal freshly isolated B-cells from three healthy subjects were labeled with CD24-APC, CD38-FITC, CD274/PD-L1-APC, CD1d-PE, CD27-PE, or CD25-PE. Radiuses of the radar plots correspond to the mean of MFI ratios (at least 3 experiments). The dark and light grey half circles correspond to EBV proliferating B-cells and EBV negative cells respectively **(A)** EBV proliferating B cells overexpress CD24 and CD38 markers. **(B)** EBV proliferating immortalized-B cells overexpress the ligand CD274/PD-L1. **(C)** Expression of CD25, CD1d, and CD27 is not increased in EBV proliferating B cells.

Figure 2. EBV proliferating B cells overexpress Breg immunosuppressive molecules.

Expression of IL-10, TGF- β 1, and IL-35 was studied by RT-qPCR and ELISA. Radiuses of the radar plots correspond to mean of mRNA relative expression levels in arbitrary units (AU, panel A) or to cytokine concentration in pg/mL (log scale, panel B). The dark and light grey half circles correspond to EBV proliferating B-cells and to EBV negative cells respectively. **(A)** Expression of *IL-10*, *TGF- β 1* and *IL-35* (*EBI3* and *IL12A* subunits) mRNA was increased in EBV proliferating B-cells. **(B)** Secretion of IL-10, TGF- β 1 and IL-35 (IL-27 β and IL-12 α subunits) was increased in EBV proliferating B-cells. Each experiment was performed at least three times

Figure 3. Autologous EBV proliferating B cells induces death of CD4⁺ T cells, but not

CD8⁺ T cells. Freshly isolated T-cells were incubated with medium alone or with their cognate autologous EBV proliferating B-cells for 48h. They were next labeled with anti-human CD4-FITC and TOPRO-3. **(A)** An example of SSC (x axis) / TOPRO-3 (y axis) double parametric histogram show that some CD4 but not CD8 T-cell death was induced by autologous proliferating B-cells **(B)** Histogram representation of TOPRO-3 positive CD4 T-

cells or CD8 T-cells, in presence or absence of their cognate EBV proliferating B-cells (n=3).
***: p<0.001 (Student t-test).

Figure 4. Autologous EBV proliferating B-cells inhibit proliferation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Freshly isolated T cells were incubated with either a cocktail of beads coated with CD2, CD3 and CD28 mAbs (activated beads), or with inactivated beads without or with autologous EBV proliferating B-cells at B/T ranging from 0 to 4 during 5 days in presence of the VPD450 dye. Cells were then washed and labeled with anti-human CD4-FITC and anti-human CD8-APC-H7 mAbs and analyzed by flow cytometry. **(A)** Examples of VPD450 fluorescence mono-parametric histograms for CD4 and CD8 T cells. Each experimental condition is indicated at the left of the panel. Results show decreased proliferation of both CD4 and CD8 T-cells in presence of their cognate EBV proliferating B-cells. **(B)** Results for 3 different healthy subjects for CD4 (upper panel) and CD8 (lower panel) T-cells. Altogether, results show decreased proliferation of both CD4 and CD8 T-cells in presence of their cognate EBV proliferating B-cells.

Figure 5. Tregs expansion by autologous EBV proliferating B-cells. T cells from healthy donors were incubated with or without supernatant or cells of their cognate autologous EBV proliferating B-cells. After 48H incubation, cells were labeled with CD3-V500, CD4-FITC, CD25-BV421 and FoxP3-PE and analyzed by flow cytometry. **(A)** Example of Treg expansion from a healthy donor. Tregs were quantified on a FoxP3/CD25 bi-parametric histogram gated on CD4 T-cells. Quadrants were set up on the negative control (left panel). The right panel shows induction of FoxP3 positive (FoxP3^{High}), mainly CD25 negative CD4 T-cells after co-culture with their cognate EBV proliferating B-cells. Percentages of cells in each quadrant are given inside the cytograms. **(B)** Histogram showing the percentage of the

FoxP3^{High} CD4 T-cells for each experimental condition, indicated on the right of the panel. Each experiment was performed at least three times. ***: p<0.001 (Student t-test).

Figure 6. Inhibition of PD-L1 repressed Treg expansion induced by EBV proliferating autologous B-cells. (A) A representative example of PD-1 over expression on T-cells after CD2, CD3 and CD28 activation or in presence of cognate EBV proliferating B-cells, compared to resting T-cells (n=3). Mono-parametric histograms of PD-1 expression were gated on CD4 T-cells by flow cytometry. (B) Histogram showing the expression level of PD1 for each experimental condition. Each experiment was performed on three different LCLs. (C) Example of FoxP3/CD25 bi-parametric histograms gated on CD4 T-cell after 48H co-culture of T-cells in presence or not of their cognate autologous EBV proliferating B-cells with either medium alone, isotypic control or the anti-PD-L1 blocking mAb, (D) Histogram showing levels of CD4⁺ Foxp3^{High} T-cells in each experimental condition for three healthy donors after 48H incubation with autologous EBV proliferating B-cells. Each experiment, different from those presented in figure 5, was performed at least three times. * : p<0.05, ***: p<0.001 (student t-test). Altogether, blocking PD-L1 resulted in repression of FoxP3^{High} T-cell expansion.

Table IA : Antibodies used for flow cytometry

Specificity	Fluorochrome	Clone	Supplier	Dilution
CD1d	PE	51.1	Biologend	1/10
CD3	V500	SK7	BD Biosciences	1/2.5
CD4	FITC	RPA-T4	BD Biosciences	1/2.5
CD8	APC-H7	SK1	BD Biosciences	1/10
CD24	APC	ALB9	Beckman Coulter	1/2.5
CD25	BV421	2A3	BD Biosciences	1/10
CD25	PE	B1.49.9	Beckman Coulter	1/10
CD27	PE	1A4CD27	Beckman Coulter	1/10
CD38	FITC	T16	Beckman Coulter	1/2.5
CD274/PD-L1	PE	29E.2A3	Biologend	1/10
CD279/PD-1	PE	EH12.2.H7	Biologend	1/10
FoxP3	PE	259D/C7	BD Biosciences	1/2.5

CD : Cluster of Differentiation, APC : Allophycocyanin, BV : Blue Violet, FITC : Fluorescein isothiocyanate, PE : Phycoerythrin, V : Violet

Table IB : Isotypic controls used for flow cytometry

Isotypic control	Fluorochrome	Clone	Supplier	Dilution
Mouse IgG1	APC	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	APC-H7	MOPC-21	BD Biosciences	1/10
Mouse IgG1	BV421	X40	BD Biosciences	1/10
Mouse IgG1	FITC	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	PE	MOPC-21	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG1	PE	MOPC-21	Biolegend	1/10
Mouse IgG1	V500-C	X40	BD Biosciences	1/2.5
Mouse IgG2b	PE	MPC-11	Biolegend	1/10

CD : Cluster of Differentiation, APC : Allophycocyanin, BV : Blue Violet, FITC : Fluorescein isothiocyanate, PE : Phycoerythrin, V : Violet

Table II: Different cell types and EBV status

Cell type	Name	EBV status	Date of establishment
Resting B cells	-	Uninfected	Freshly isolated
Burkitt lymphoma (BL)	BL2, BL41	Uninfected	> 20 years
	P3HR1	Atypical latency	> 20 years
	BL2B95.8, BL41B95.8	Latency III program	> 20 years
Lymphoblastoid cell line (LCL)	PRI, RUD	Latency III program	> 20 years
	C0401, J1209, N2803	Latency III program	< 1 year

Figure 1

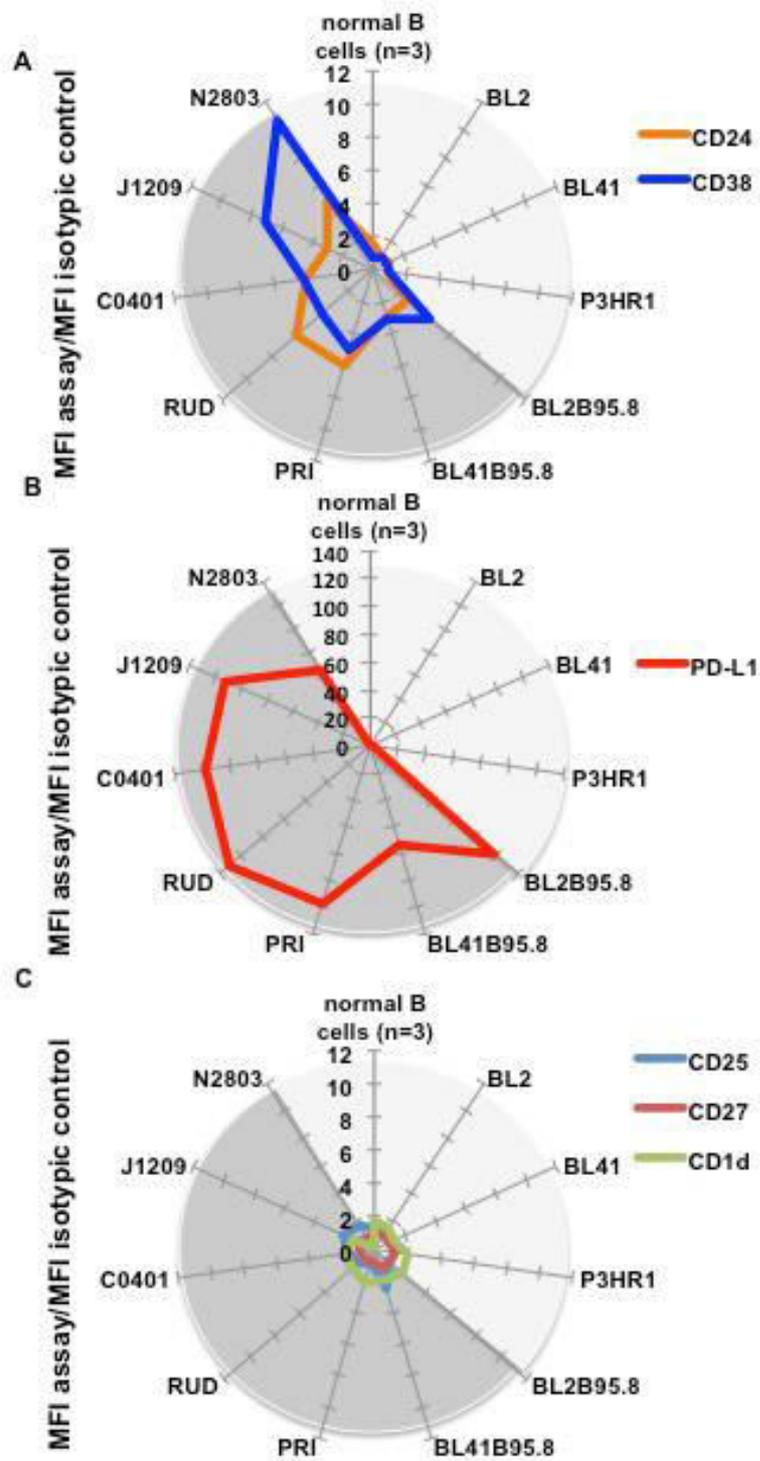


Figure 2

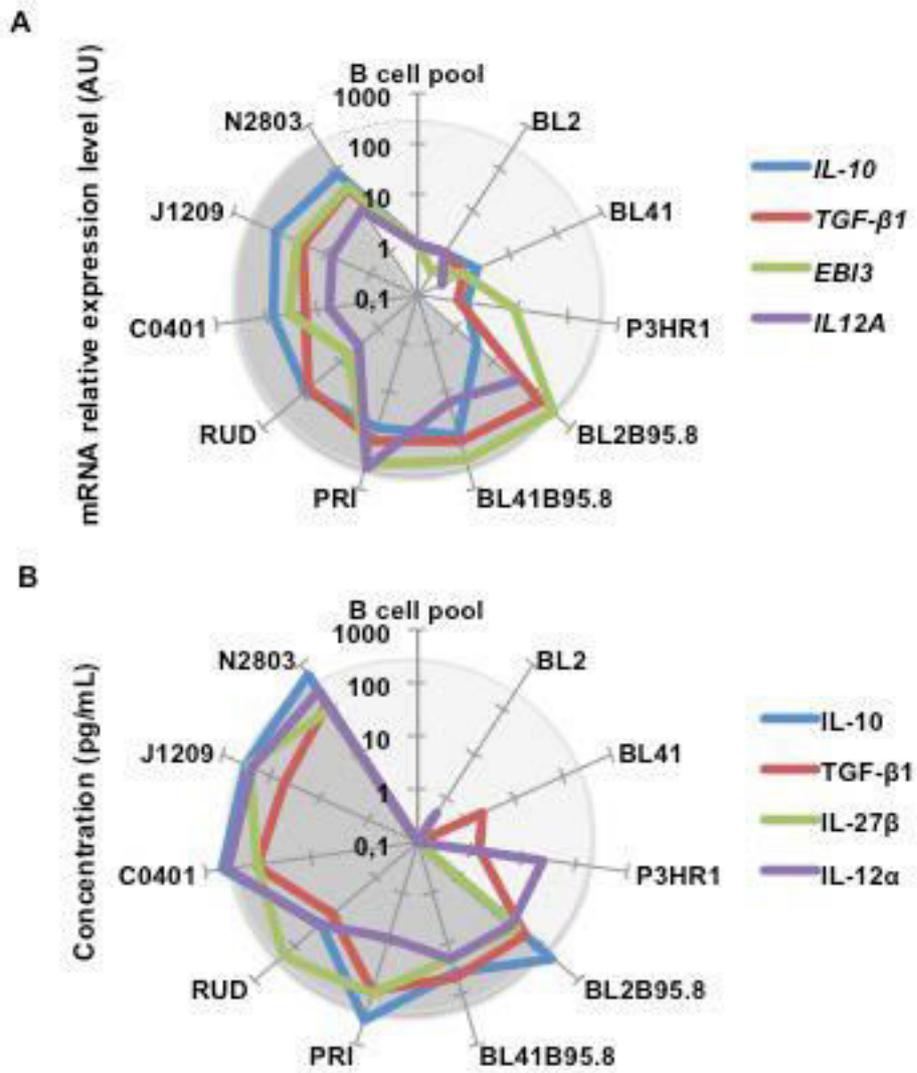


Figure 3

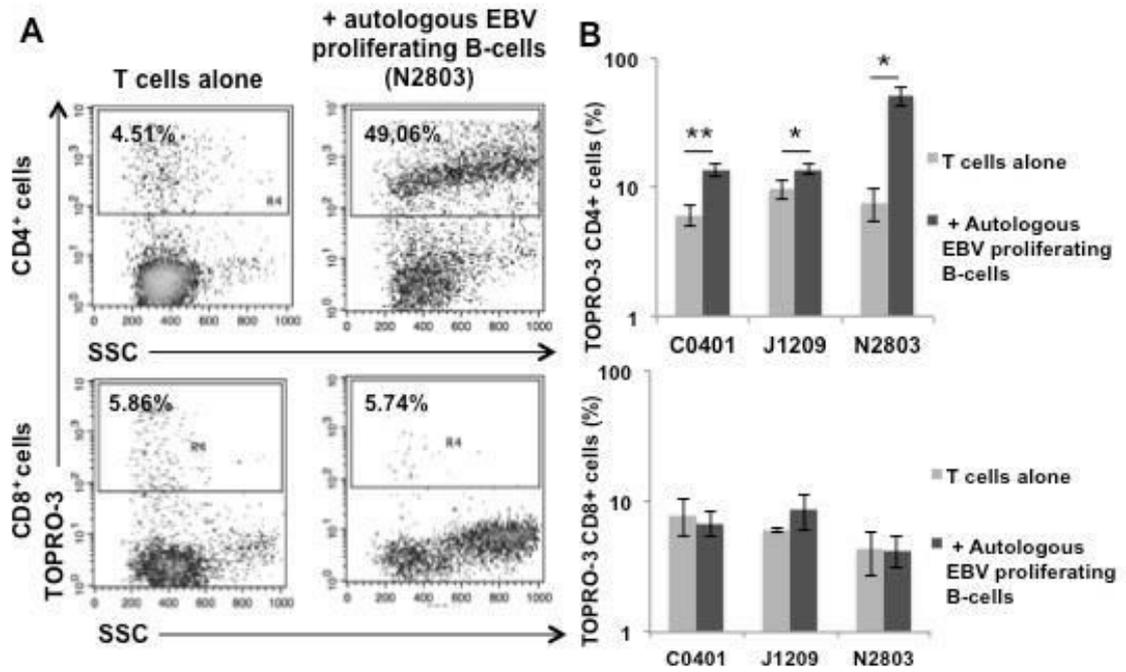


Figure 4

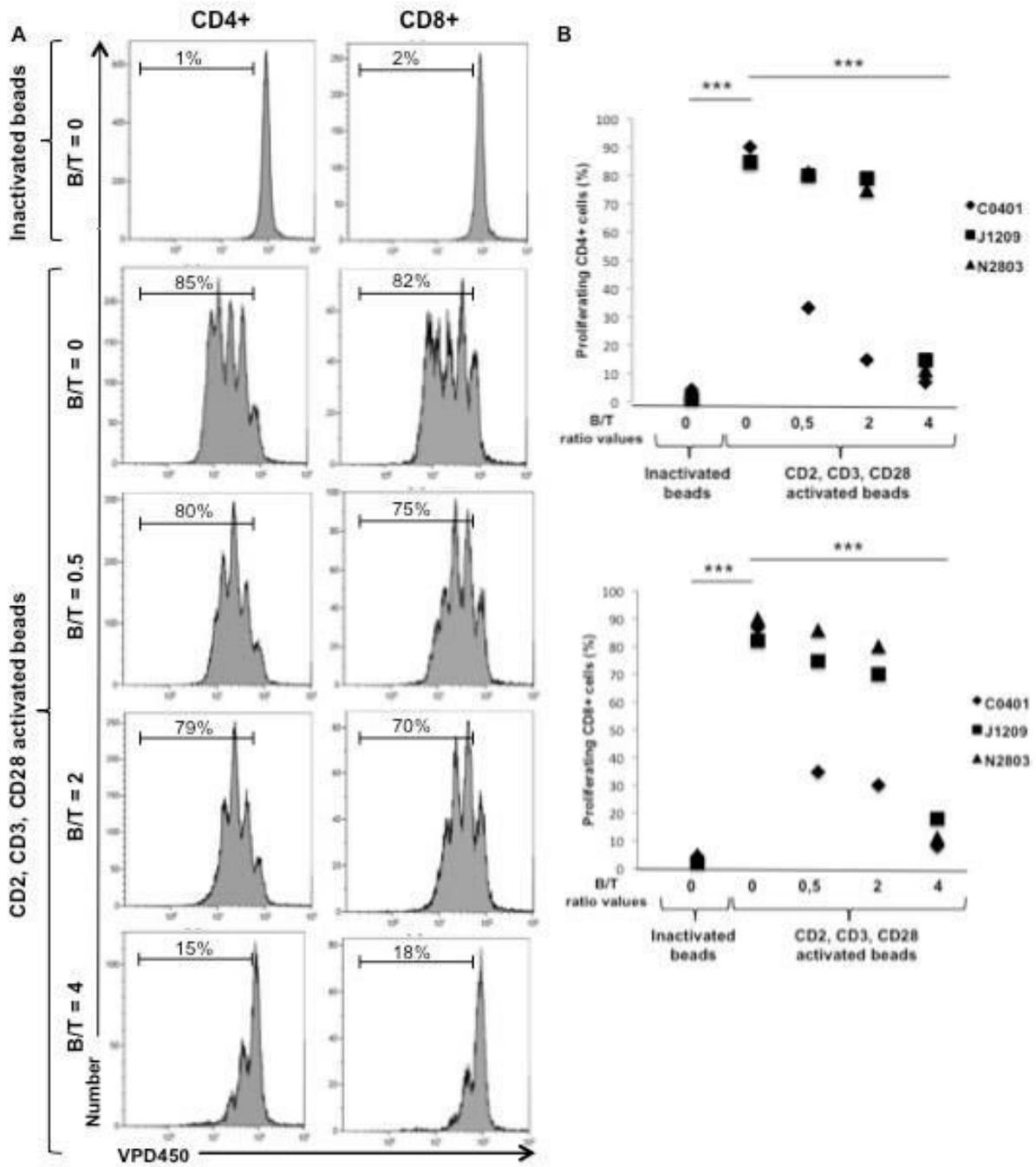


Figure 5

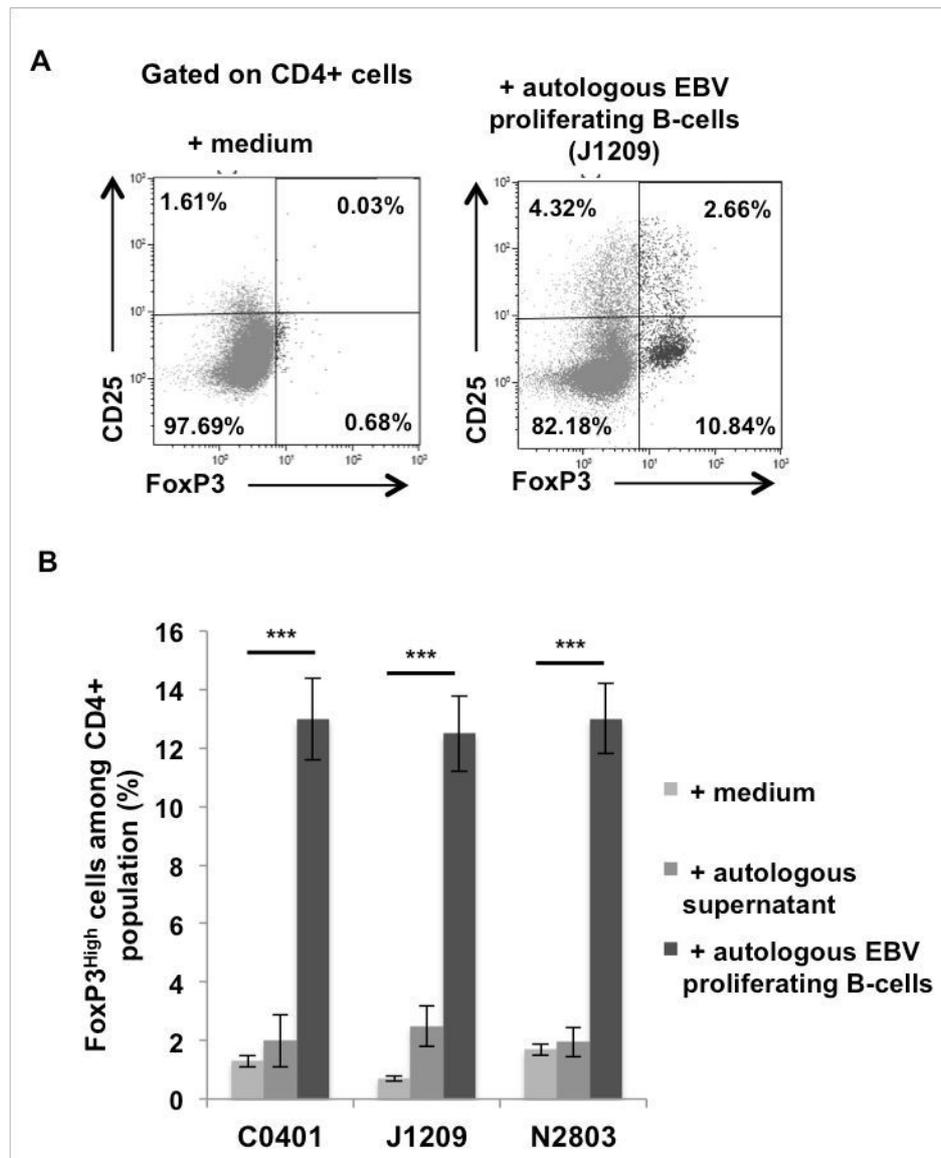
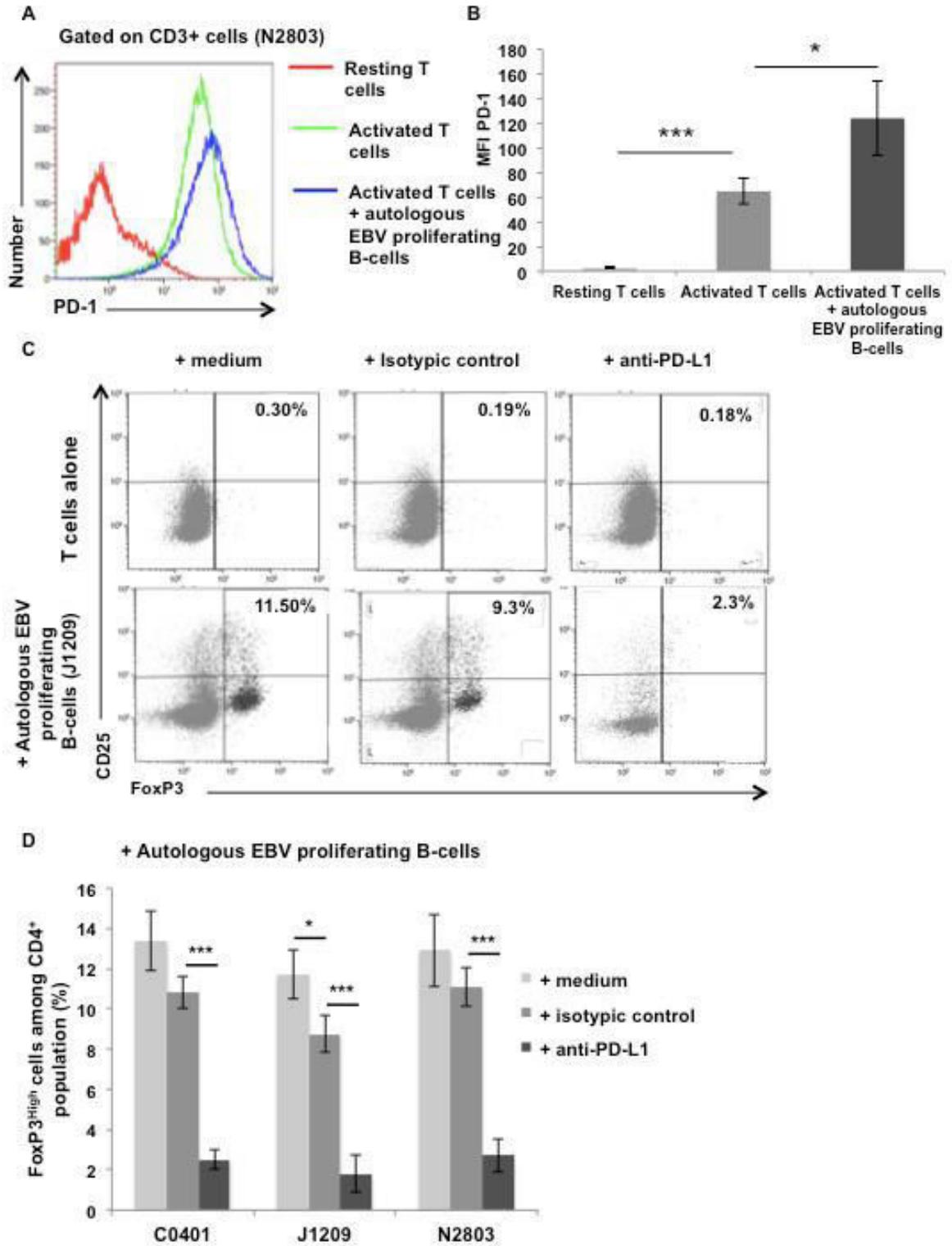


Figure 6



III/ Conclusion

Cette étude a permis de montrer que les cellules immortalisées par l'EBV en programme de latence III possèdent le phénotype des cellules B régulatrices immatures (CD24^{High} CD38^{High} PD-L1^{High}). Nous avons également pu identifier cette sous-population grâce à l'absence de marqueurs de surface spécifiques des autres sous-types : CD25, CD27, CD1d. Ces cellules expriment des niveaux élevés des molécules immunosuppressives caractéristiques des Bregs : IL-10, TGF- β 1 et IL-35, tant au niveau transcriptionnel que sécrétoire. Les différentes lignées en latence III utilisées ne présentent pas les mêmes niveaux de cytokines immunosuppressives, reflétant l'aspect physiologique rencontré chez les patients.

Nous avons pu identifier que ces cellules ont la capacité de différencier les lymphocytes T isolés du sang périphérique en Tregs *ex vivo* dans un système autologue, propriété des cellules Bregs immatures. En plus d'induire une population de iTregs (Tregs inductibles), les cellules en programme de latence III de l'EBV possèdent la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ et des T helpers CD4⁺.

PD-L1 est une molécule phare des cellules immortalisées par l'EBV en latence III, ainsi que des Bregs immatures. Nous avons identifié que l'inhibition de cette dernière permet la diminution significative du pourcentage de Tregs, lorsque les cellules B et T autologues sont co-cultivées. Ces résultats sont prometteurs pour le développement de thérapies anti-Tregs, en ciblant un des acteurs de l'axe PD-L1/PD-1, dans le cadre de lymphoproliférations liées à la latence III de l'EBV.

A notre connaissance, il s'agit de la première fois où les cellules B immortalisées par l'EBV en latence III sont indiquées comme phénotypiquement et fonctionnellement similaires aux Bregs immatures.

Suite à ce travail, plusieurs interrogations émergent : étant donné que les cellules en latence II et III partagent la plupart des gènes exprimés en latence III, les cellules issues de lymphoproliférations caractérisées par la latence II de l'EBV seraient-elles des Bregs ? Les réponses T inhibées par les cellules en latence III de l'EBV sont-elles spécifiques de l'EBV ?

Les cellules B des patients atteints de la MNI ont-elles un phénotype de Bregs immatures ?
Les cellules B issues de tumeurs humaines EBV-positives ont-elles un phénotype de Bregs ?
Y a-t-il une proportion plus importante de Tregs au sein de ces tumeurs ? Si l'on injectait les cellules B en latence III de l'EBV dans des souris SCID, l'agressivité et la grosseur des tumeurs seraient-elles liées au niveau de cytokines immunosuppressives sécrétées ? Les tumeurs seraient-elles positives pour PD-L1 et FoxP3 ?

Le TGF- β étant connu pour ses capacités à induire les lymphocytes T CD4⁺ périphériques en Tregs, quel est le poids de cette cytokine dans la différenciation des cellules T en Tregs ?
Quel est le poids des autres cytokines phares immunosuppressives des Bregs (IL-10, IL-35) ?
De ces questionnements, une autre interrogation majeure se pose : quels sont les mécanismes moléculaires sous-jacents à la surexpression des molécules immuno-modulatrices IL-10, TGF- β 1 et IL-35 ? Cette dernière question essentielle fait l'objet de la seconde partie des résultats.

**Partie 2 : Etude des mécanismes
moléculaires sous-jacents à la
surexpression des molécules
immunosuppressives IL-10, TGF- β 1
et IL-35**

I/ Introduction

Comme décrit dans l'article, les cellules en programme de latence III de l'EBV surexpriment l'IL-10, le TGF- β 1 et l'IL-35 aux niveaux transcriptionnels et sécrétoires, reflétant leur haut potentiel immunosuppresseur.

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents à cette surexpression, afin de mieux appréhender les différents acteurs de l'induction d'un micro-environnement immuno-suppresseur.

Etant donné que NF- κ B et c-Myc sont les deux facteurs de transcription majeurs détournés par les cellules en programme de latence III de l'EBV (Faumont et al., 2009), nous avons inhibé par l'intermédiaire d'inhibiteurs chimiques ces deux facteurs et estimé l'expression transcriptionnelle relative des trois molécules immunosuppressives.

Nous montrons par cette méthode que l'IL-10 semble être positivement régulée par NF- κ B et c-Myc, TGF- β 1 négativement par ces deux derniers, et l'IL-35 positivement par NF- κ B et négativement par c-Myc, et ce de manière dose-dépendante.

II/ Matériels et Méthodes

II.1. Culture cellulaire et traitements chimiques

Les lignées cellulaires utilisées sont issues de lymphomes de Burkitt (BL) BL2 et BL41, leurs homologues infectés par l'EBV (BL2B95.8 et BL41B95.8, latence III), ainsi que les lignées cellulaires lymphoblastoïdes (LCLs, latence III) anciennement (1602, PRI, RUD) ou récemment immortalisées (C0401, J1209 et N2803). La lignée cellulaire P3HR1, en programme de latence atypique, a également été étudiée. Elles sont cultivées dans du milieu RPMI 1640 (Gibco BRL-Life Technologies, Cergy-Pontoise, France) supplémenté avec 10% de sérum de veau fetal tetracycline-free décomplémenté (SVF; Clon- tech, Palo Alto, CA), de vitamines 1X, d'acides aminés 1X, de 50 UI/mL de pénicilline, 50 µg/mL de streptomycine, de L-glutamin à 200mM et de pyruvate à 100 mM (tous provenant de Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA) à 37°C, dans une atmosphère humide à 5% de CO₂.

Les cellules mortes et les débris cellulaires ont été éliminés en déposant les suspensions cellulaires sur du milieu de séparation des lymphocytes (MSL) (Eurobio,d=1.077) toutes les trois à quatre semaines. Les cellules en suspension ont été centrifugées pendant 5 minutes à 1200 rpm, et le culot cellulaire a été repris avec 8 mL de RPMI complet à 10% de SVF. La suspension a été déposée délicatement sur 4 mL de Ficoll. L'ensemble a été centrifugé durant 30 minutes à 2500 RPM sans décélération. L'anneau récupéré, composé de cellules vivantes mononuclées, a été prélevé à l'interface du milieu de culture et du milieu de séparation. Un lavage a été effectué suite à cette étape avec du RPMI dépourvu de SVF. Une numération cellulaire a été effectuée à l'aide du compteur de cellules (Cell-Dyn Emerald Abbot, Rungis, France) et les cellules ont été replacées en culture à une concentration de 0,4 million de cellules/mL.

Les lignées BL et les LCLs ont été traitées soit avec l'inhibiteur chimique de c-Myc 10058-F4 [(Z,E)-5-(4-ethylbenzylidene)-2-thioxothiazolidin-4-one] (Calbiochem, La Jolla, CA) à des concentrations de 0, 10 ou 20 µM, ou avec l'inhibiteur chimique de NF-κB PHA408 (99,4% ; Axon Medchem, VA) à 0, 5 ou 10 µM. Les concentrations des inhibiteurs chimiques ont été déterminées en fonction de l'efficacité d'inhibition par western-blot, et la viabilité des cellules par un test Annexine-V – TOPRO-3 en cytométrie en flux.

II.2. Extraction d'ARN au trizol

Suite au traitement de 48h par les inhibiteurs, l'ARN d'environ 5.10^6 cellules de chaque lignée cellulaire a été extrait par 500 μL de trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) durant 5 minutes à l'abri de la lumière. Puis, 100 μL de chloroforme ont été additionnés et une centrifugation de 12 000 RPM durant 20 minutes a été effectuée. Les ARNs ont été ensuite précipités dans de l'isopropanol 100% froid. Le culot d'ARN a ensuite été lavé avec de l'éthanol 75% froid et resuspendu dans de l'eau ultrapure après séchage intégral du tube. L'ARN extrait a été quantifié par mesure de l'absorbance à 260 nm grâce au NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) et la pureté de l'échantillon a été pré-évaluée par le ratio d'absorbance 260/280 et 260/230. La qualité des ARN a ensuite été analysée en faisant migrer 1 μg d'ARN supplémenté d'eau ultrapure et de tampon de charge (Volume final : 24 μL) en conditions RNase-free durant 30 minutes à 50 Volts.

II.3. Rétrotranscription des ARNs

2 μg d'ARN ont été ajoutés à un mix de rétro-transcription (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA) pour former l'ADNc. Le mélange réactionnel comprend 2 μL de tampon 10X, 0,8 μL de dNTP et 2 μL de primers. Après addition des ARNs et d'un microlitre d'enzyme, le volume réactionnel est ajusté à 20 μL par addition d'eau ultrapure, la quantité d'eau apportée dépendant de la concentration de la solution d'ARN. Pour conserver le rapport de quantité entre ARNs et ADNc, la rétrotranscription s'effectue selon le protocole : 10 minutes à 25°C suivies de 2h à 37°C et de 5 minutes à 85°C.

II.4. Analyse du niveau de transcription par PCR quantitative en temps réel

Pour chaque gène à analyser, une sonde Taqman (Applied Biosystems, Foster City, CA) spécifique est utilisée. Les ADNc obtenus suite à la rétrotranscription sont dilués au 20^{ème} afin de les obtenir à une concentration de 6 ng/ μL . Le mélange réactionnel comprend 10 μL de Master Mix 2 X (Applied Biosystems), 1 μL de Sonde Taqman (Applied Biosystems), 4 μL d'ADNc et 5 μL d'eau ultrapure.

Les sondes utilisées permettent d'évaluer l'expression des gènes *IL-10*, *TGF- β 1*, *EBI3* et *IL12A* humains (Hs00961622-m1 ; Hs00820148-g1 ; Hs01057148-m1 ; et Hs01073447,

respectivement (Applied Biosystems, Foster City, CA)). Ces sondes Taqman sont couplées à un fluorophore rapporteur, ici le 6-carboxyfluorescéine (FAM), ce qui permet la quantification en temps réel grâce à un détecteur placé à l'intérieur du thermocycleur (ABI PRISM 7000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). L'expression du gène HPRT1 humain (Hs02800695-m1), gène de référence, est également mesurée afin de pouvoir effectuer une quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt.

Le programme de la QPCR est le suivant : activation des sondes à 50°C pendant 2 minutes, puis activation de la polymérase par un traitement à 95°C pendant 10 minutes, suivent 40 cycles (dénaturation 95°C, 15 secondes ; hybridation/élongation 60°C ; 1 minute).

La quantification utilisée dans cette étude est une quantification relative reposant sur des gènes de référence, elle est donc toujours le résultat d'un rapport entre deux valeurs. La valeur « CT » où le « CT » représente le nombre de cycles PCR nécessaire à l'obtention d'une quantité « X » d'ADN significative et donnant lieu à un signal lisible de manière précise par le détecteur. Deux types de « CT » sont distingués, les « CT » des gènes de référence et les « CT » des gènes cibles. Les gènes de référence sont choisis pour la stabilité de leur niveau de transcription, ainsi quel que soit le test, nous devrions toujours obtenir le même « CT » pour ces gènes de référence. Pour s'affranchir des variations qu'il pourrait y avoir, on calcule pour chaque gène cible la valeur appelée « Δ CT » qui correspond au « CT » du gène cible moins le « CT » du gène de référence au cours du même test. Pour comparer les différents tests entre eux, il nous suffit alors de comparer les valeurs de « Δ CT » des gènes cibles, on obtient ainsi les valeurs de « $\Delta\Delta$ CT ». Ces valeurs nous servent à calculer les variations du niveau de transcription appelées « RQ » (Relative Quantity) qui correspondent au nombre de fois où un gène est surexprimé ou sous-exprimé pour un test par rapport à un test référence (ici le temps 0h de différenciation). Si la quantité d'ARN n'a pas changé entre les deux tests le « RQ » sera alors de 1, si la quantité d'ARN a augmenté le RQ sera supérieur à 1 et si la quantité d'ARN a diminué le RQ sera inférieur à 1.

III/ Résultats préliminaires

III.1. Régulation positive de l'*IL-10* par NF- κ B et c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV

Nous avons inhibé NF- κ B ou c-Myc durant 48h par le biais d'inhibiteurs chimiques. La spécificité de ces inhibiteurs a été vérifiée par des travaux antérieurs du laboratoire (Faumont et al., 2009; Chanut et al., 2014). Puis l'expression relative des transcrits (ARNm) a été quantifiée dans les lignées de lymphomes de Burkitt (BL) infectées (BL2B95.8, BL41B95.8) ou non (BL2, BL41) par l'EBV. Les expériences ont également été menées sur la lignée P3HR1 (latence atypique) et sur les LCLs 1602, C0401, J1209, N2803, PRI, RUD (latence III). La référence cellulaire choisie (pool de cellules B de référence), permet de quantifier en valeur relative l'expression des ARNm, est issue de 3 échantillons de sang de d'individus sains, dont les lymphocytes B ont été isolés par immunosélection négative. Le gène de référence utilisé est le gène humain *HPRT1*, gène exprimé de manière constitutive par les cellules B.

III.1.A. Inhibition de NF- κ B avec le PHA-408

Nous observons une diminution significative de l'expression relative de l'*IL-10* dans toutes les lignées en programme de latence III de l'EBV lorsque NF- κ B est inhibé, alors qu'il n'y a pas de différence significative pour les lignées BL négatives (BL2, BL41) et pour P3HR1. Nous constatons également que cette diminution s'opère de manière dose-dépendante, comme nous l'observons entre les doses 5 et 10 μ M de PHA-408 pour les lignées en latence III. Nous pouvons donc penser que l'interleukine-10 serait positivement régulée par le facteur de transcription NF- κ B dans les lignées immortalisées par l'EBV en latence III, contrairement aux lignées qui sont non infectées par le virus ou dans un autre type de latence (**Figure 26**).

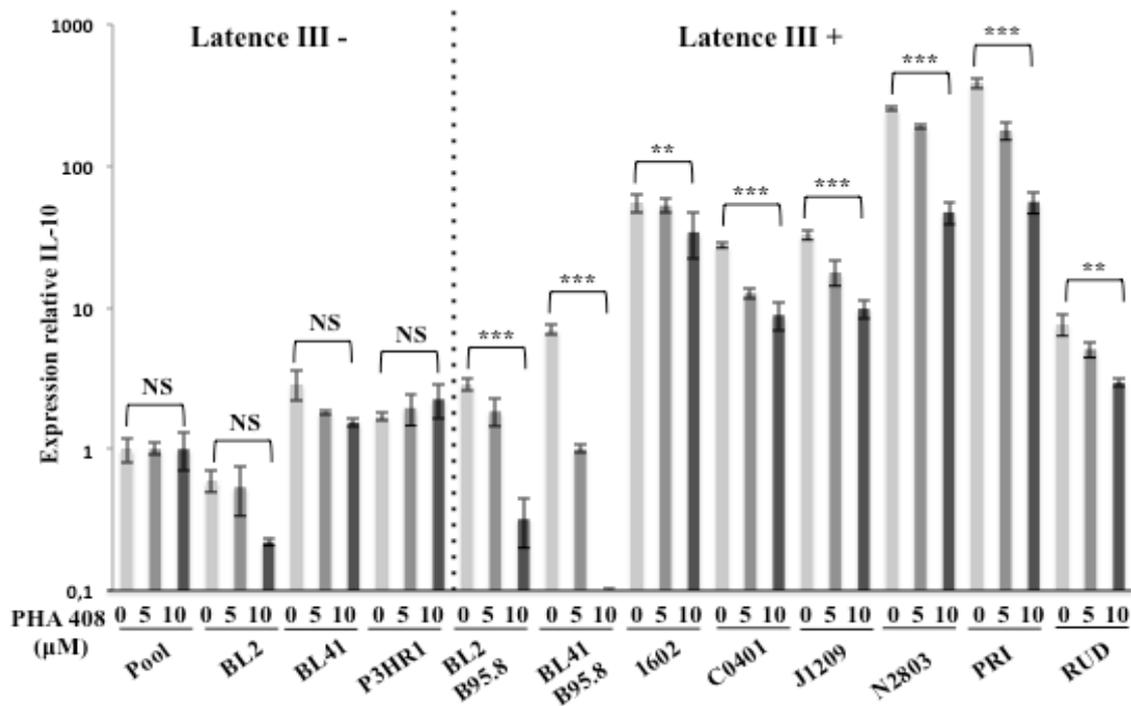


Figure 26 : Expression relative des ARNm de l'*IL-10* lors de l'inhibition de NF- κ B par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du PHA-408 aux doses 0, 5 ou 10 μ M durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de l'*IL-10* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le Δ CT (=moyenne CT *IL-10* – moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta$ CT (= Δ CT *IL-10* de l'échantillon - Δ CT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative (= $2^{-\Delta\Delta$ CT}) ont été calculés. Les valeurs d'expression relatives ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 10 μ M.

III.1.B. Inhibition de c-Myc avec 10058-F4

Tout comme pour les résultats obtenus avec l'inhibition de NF- κ B, nous remarquons une baisse significative de l'expression relative d'*IL-10* lorsque c-Myc est inhibé aux doses 10 et 20 μ M de l'inhibiteur chimique 10058-F4 dans les lignées en latence III. Hormis pour la lignée BL41B95.8, nous constatons que cette diminution est dose-dépendante. Il n'y a pas de différence significative observée entre les différentes doses de 10058-F4 dans les lignées qui ne sont pas en programme de latence III de l'EBV (**Figure 27**).

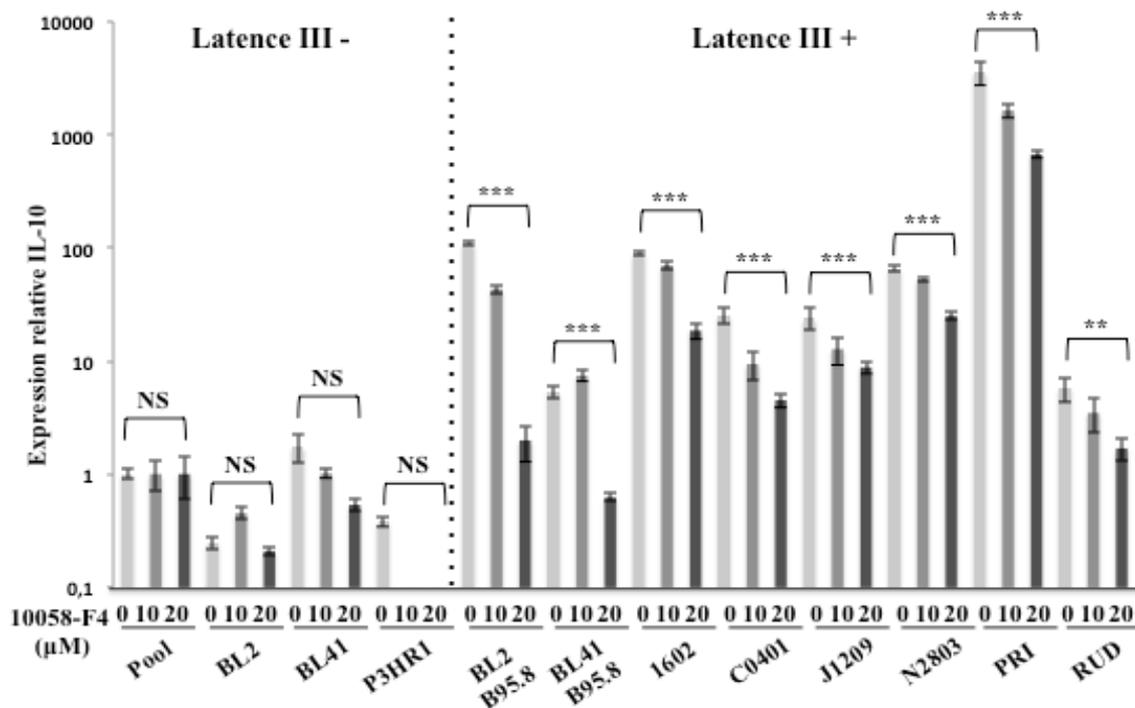


Figure 27 : Expression relative des ARNm de l'*IL-10* lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du 10058-F4 aux doses 0, 10 ou 20 μM durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de l'*IL-10* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le ΔCT (=moyenne CT *IL-10* – moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta\text{CT}$ (= ΔCT *IL-10* de l'échantillon - ΔCT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative (= $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$) ont été calculés. Les valeurs d'expression relatives ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 20 μM .

Nous montrons que l'*IL-10* serait positivement régulée par les deux facteurs de transcription NF- κB et c-Myc dans les lignées immortalisées par l'EBV en latence III.

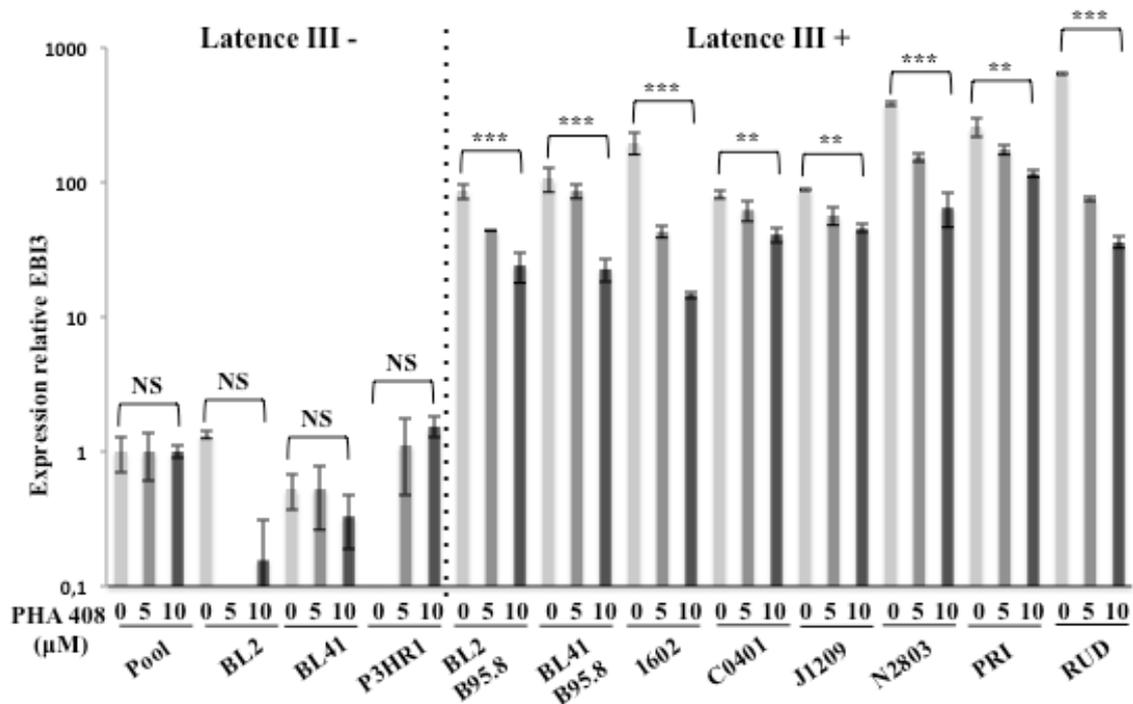
III.2. Régulation positive de l'*IL-35* par NF- κB et partiellement négative par c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV

Nous avons effectué les mêmes expériences que celles décrites dans le paragraphe III.1, et observé l'expression relative des deux sous-unités de l'*IL-35*, qui sont *EBI3* et *IL12A*.

III.2.A. Inhibition de NF- κ B avec le PHA-408

Nous montrons qu'il y a une diminution significative de l'expression relative d'*EBI3* (**Figure 28A**) et d'*IL12A* (**Figure 28B**) lorsque NF- κ B est inhibé durant 48h pour toutes les lignées en latence III de l'EBV. Aucune différence significative n'est observée dans les lignées de lymphomes de Burkitt non infectées par l'EBV (BL2, BL41) et dans la lignée P3HR1 en latence atypique, ce qui confirme la spécificité de la régulation des lignées immortalisées par l'EBV par NF- κ B. Les deux sous-unités de l'*IL-35* semblent être positivement régulées par NF- κ B.

A.



B.

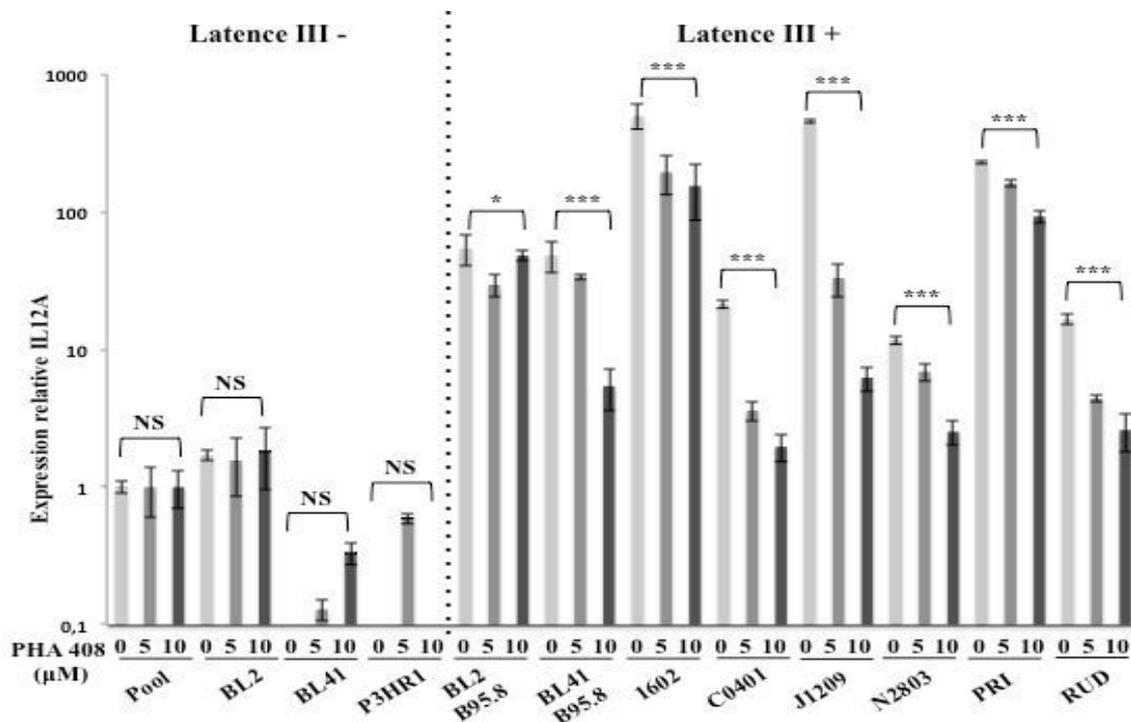


Figure 28 : Expression relative des ARNm de l'*IL-35* (*EBI3* et *IL12A*) lors de l'inhibition de NF- κ B par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

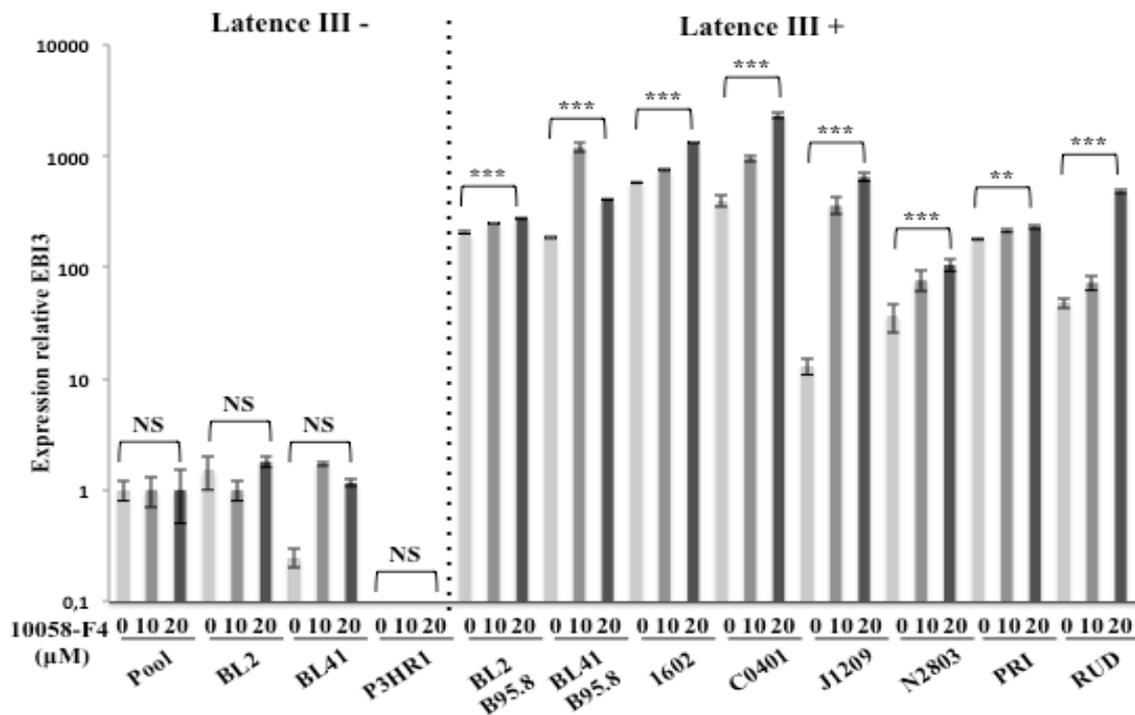
A. Expression relative de la sous-unité *EBI3*. B. Expression relative de *IL12A*. Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du PHA-408 aux doses 0, 5 ou 10 μ M durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de *EBI3*, *IL12A* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le Δ CT (=moyenne CT *EBI3* ou *IL12A* - moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta$ CT (= Δ CT *EBI3* ou *IL12A* de l'échantillon - Δ CT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative (= $2^{-\Delta\Delta$ CT}) ont été calculés. Les valeurs d'expression relatives ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 10 μ M.

III.2.B. Inhibition de c-Myc avec 10058-F4

En inhibant c-Myc avec un inhibiteur chimique spécifique, nous avons identifié que l'expression relative d'*EBI3* est significativement augmentée dans toutes les lignées en programme de latence III de l'EBV, alors qu'il n'existe pas de différence significative pour les lignées en latence III négatives. De plus, cette augmentation s'effectue de manière dose-dépendante, hormis pour la lignée BL41B95.8 où l'on constate une hausse plus importante de

l'expression relative d'*EBI3* pour la dose 10 μ M que pour la dose 20 μ M de 10058-F4. Ces résultats montreraient que c-Myc régulerait négativement l'expression relative de la sous-unité EBI3 de l'IL-35 dans les lignées immortalisées par l'EBV en latence III (**Figure 29A**). Lorsque c-Myc est inhibé par différentes concentrations de 10058-F4, nous constatons que l'expression de l'*IL12A* est significativement diminuée pour les lignées de lymphomes de Burkitt (BL) infectées par l'EBV (BL2B95.8, BL41B95.8), ainsi que pour les LCLs anciennement établies (1602, PRI, RUD), alors qu'elle est augmentée de manière significative pour les LCLs récemment immortalisées (C0401, J1209, N2803). Aucune différence n'est signalée pour les lignées de lymphomes de Burkitt non infectées par l'EBV (BL2, BL41), ainsi que pour le pool de lymphocytes B et la lignée en latence atypique P3HR1. Nous montrons que les variations de l'expression relative de l'*IL12A* sont similaires avec celles d'*EBI3* uniquement pour les LCLs récemment établies, et que ces modulations diffèrent pour toutes les autres lignées en latence III (**Figure 29B**). Nous montrons que c-Myc semble réguler négativement l'expression relative d'*EBI3*, et positivement l'expression relative de l'*IL12A*, hormis pour les lignées cellulaires lymphoblastoïdes récemment établies.

A.



B.

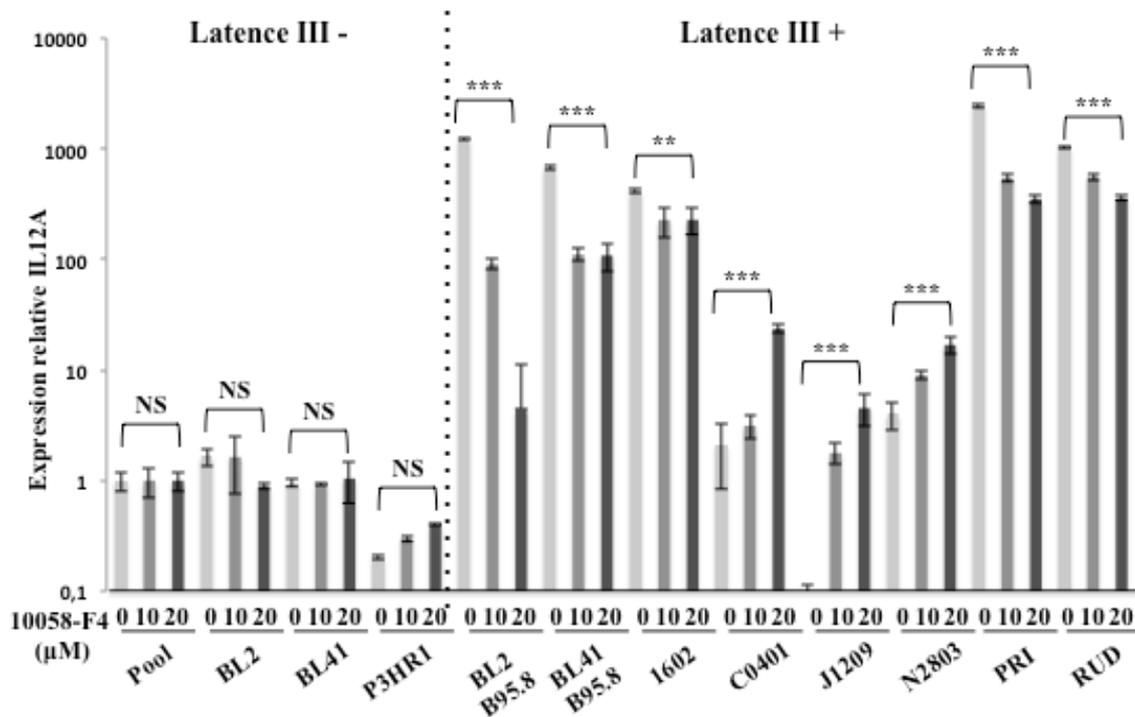


Figure 29 : Expression relative des ARNm de l'*IL-35* (*EBI3* et *IL12A*) lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

A. Expression relative de la sous-unité *EBI3*. **B.** Expression relative de *IL12A*. Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du 10058-F4 aux doses 0, 10 ou 20 μM durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de *EBI3*, *IL12A* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le ΔCT (=moyenne CT *EBI3* ou *IL12A* – moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta CT$ (= ΔCT *EBI3* ou *IL12A* de l'échantillon - ΔCT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative ($=2^{-\Delta\Delta CT}$) ont été calculés. Les valeurs d'expression relatives ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 20 μM.

III.3. Régulation négative de *TGF-β1* par NF-κB et c-Myc dans les lignées en programme de latence III de l'EBV

III.3.A. Inhibition de NF-κB avec le PHA-408

Nous remarquons une augmentation significative de l'expression relative de *TGF-β1* dans les lignées en latence III du programme de l'EBV, comparativement aux lignées en latence III négatives, qui ne présentent pas de variation significative. Nous constatons qu'il

existe différents niveaux d'expression relative de *TGF-β1* et de variation de celle-ci, selon les lignées cellulaires étudiées. Nous en déduisons que l'expression relative de cette molécule immunosuppressive semble être régulée négativement par NF-κB dans les lignées en programme de latence III de l'EBV (**Figure 30**).

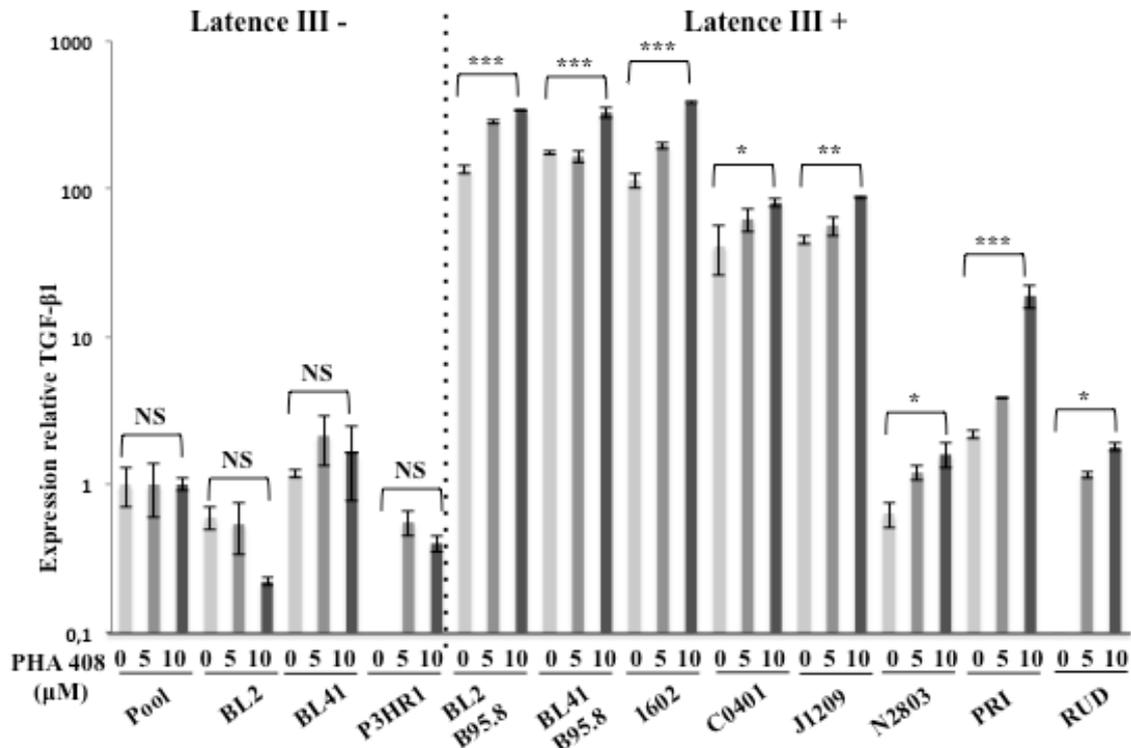


Figure 30: Expression relative des ARNm de *TGF-β1* lors de l'inhibition de NF-κB par le PHA-408 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du PHA-408 aux doses 0, 5 ou 10 μM durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de *TGF-β1* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le ΔCT (=moyenne CT *TGF-β1* – moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta CT$ (= ΔCT *TGF-β1* de l'échantillon - ΔCT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative ($=2^{-\Delta\Delta CT}$) ont été calculés. Les valeurs d'expression relative ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 10 μM.

III.3.B. Inhibition de c-Myc avec le 10058-F4

Lorsque c-Myc est inhibé à différentes concentrations de 10058-F4, nous constatons une augmentation significative de l'expression relative de *TGF-β1* dans les lignées de cellules B en latence III du programme de l'EBV. Ces hausses d'expression relative sont dépendantes de la concentration de l'inhibiteur chimique, hormis pour la lignée issue du lymphome de

Burkitt BL2B95.8 où l'augmentation la plus élevée est constatée pour la dose intermédiaire (10 μ M de 10058-F4). Au contraire, nous n'observons pas de différence notable entre les niveaux d'expression de *TGF- β 1* lorsque c-Myc est inhibé dans les lignées qui ne sont pas infectées par l'EBV (Pool cellules B, BL2, BL41) ou en programme de latence atypique (P3HR1). Nous suggérons que c-Myc régulerait négativement l'expression relative de *TGF- β 1* dans les lignées en programme de latence III de l'EBV étudiées (**Figure 31**).

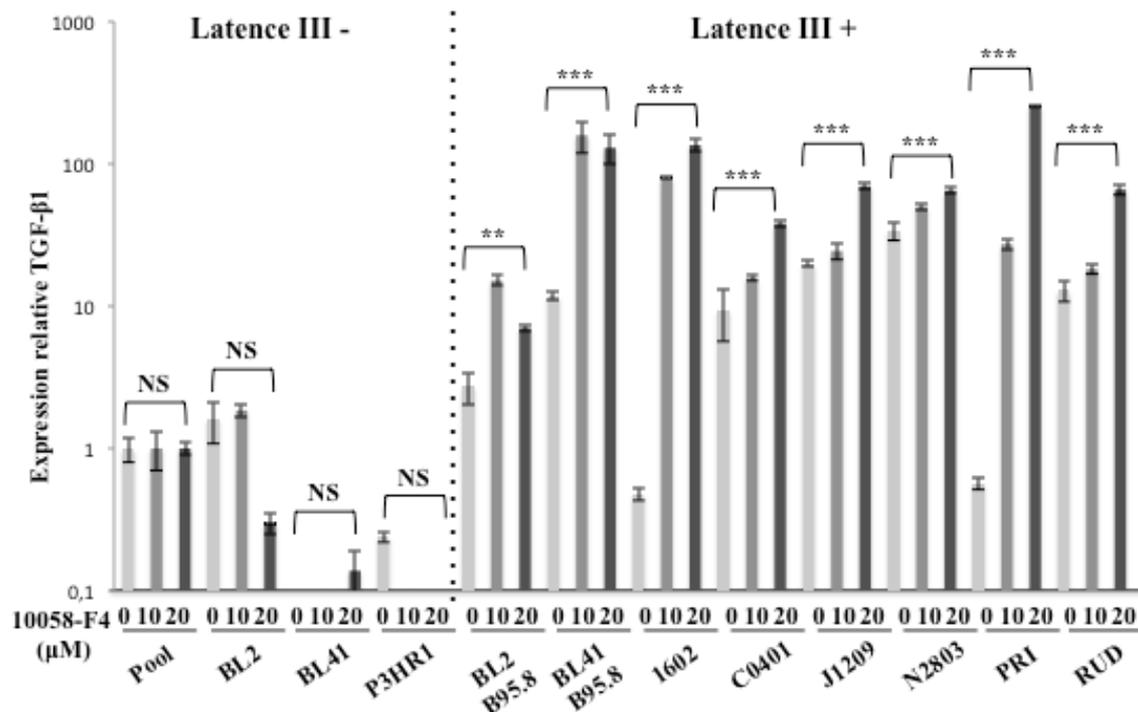


Figure 31 : Expression relative des ARNm de *TGF- β 1* lors de l'inhibition de c-Myc par 10058-F4 dans les lignées en latence III négatives *versus* latence III positives.

Les cellules des différentes lignées ont été traitées avec du 10058-F4 aux doses 0, 10 ou 20 μ M durant 48h. Pour chaque ARNm (pool de lymphocytes B et lignées d'intérêt), l'expression relative de *TGF- β 1* et de *HPRT1* (gène de ménage) a été quantifiée et une valeur de CT (Cycle Threshold) a été obtenue. Le pool de lymphocytes B a été choisi comme référence. Pour chaque échantillon, le Δ CT (=moyenne CT *TGF- β 1* – moyenne CT *HPRT1*), puis le $\Delta\Delta$ CT (= Δ CT *TGF- β 1* de l'échantillon - Δ CT pool de lymphocytes B), et enfin l'expression relative (= $2^{-\Delta\Delta$ CT}) ont été calculés. Les valeurs d'expression relative ont été calculées en prenant le pool de lymphocytes B isolés (nommé pool). Le gène *HPRT1* a servi de gène de référence pour les calculs. Les barres d'erreurs représentent les écarts types des moyennes de trois expériences indépendantes. Les tests de Student ont été calculés en comparant les valeurs des doses 0 et 20 μ M.

La **Figure 32** récapitule les différentes régulations exercées sur les molécules immunosuppressives *IL-10*, *IL-35* et *TGF- β 1* par les facteurs de transcription NF- κ B et c-Myc.

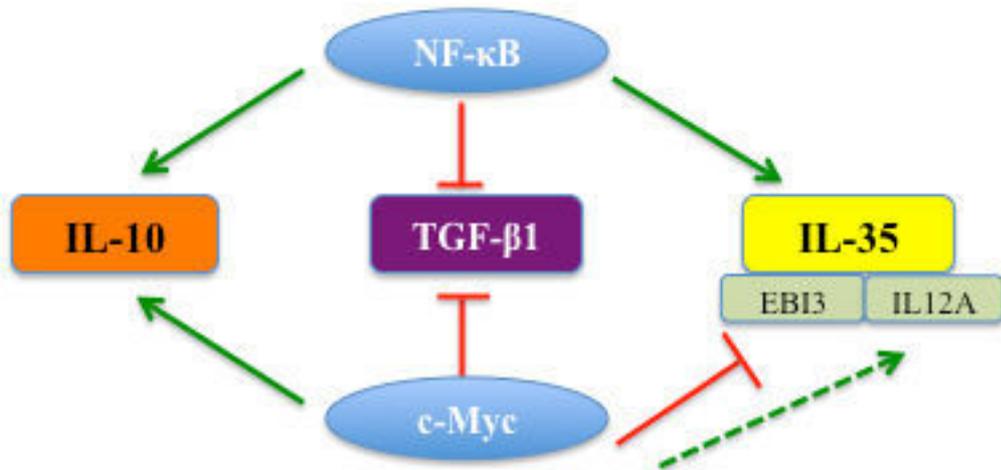


Figure 32 : Schéma récapitulatif des mécanismes sous-jacents à la régulation de l'expression transcriptionnelle de l'*IL-10*, d'*IL-35* et de *TGF-β1* par c-Myc et NF-κB dans les lignées en programme de latence III de l'EBV.

IV/ Discussion

Nous montrons dans ce travail que les trois cytokines immunosuppressives des Bregs surexprimées dans les cellules B immortalisées par l'EBV sont majoritairement régulées par les deux facteurs de transcription majeurs de l'EBV, NF- κ B et c-Myc. Toutefois, il serait intéressant de compléter ce travail par d'autres méthodes, afin de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus avec les inhibiteurs chimiques. Nous pourrions quantifier l'expression transcriptionnelle des trois cytokines IL-10, TGF- β 1 et des deux sous-unités de l'IL-35 grâce à la lignée P493.6, doublement inductible pour NF- κ B et c-Myc, que nous avons au laboratoire. Des transfections cellulaires avec des vecteurs permettant la surexpression de NF- κ B et c-Myc pourraient également être effectuées pour confirmer nos hypothèses.

Le fait que TGF- β 1 semble être négativement régulé par ces deux facteurs est en corrélation avec les données de la littérature, qui montrent que cette cytokine joue un rôle dans le passage de la latence au cycle lytique (Liang et al., 2002). L'induction de production de virions de l'EBV dans une cellule EBV positive est permise par l'expression du gène *BZLF1*, qui permet la commutation entre l'état de latence et le cycle lytique. Le gène *BZLF1* peut être induit par l'expression de molécules activatrices, telles que le TGF- β et le 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acétate. Liang et al ont montré que l'activation de *BZLF1* par TGF- β s'effectue grâce à une coopération entre les protéines Smad et c-Jun/c-Fos (Liang et al., 2002). Etant donné que NF- κ B et c-Myc sont les deux principaux facteurs de transcription du programme de latence III, il apparaît cohérent que ces deux facteurs régulent négativement TGF- β , afin que les cellules restent en phase de latence III.

Malgré ces données, nous montrons que toutes les lignées cellulaires en latence III de l'EBV surexpriment TGF- β 1, comparé aux lignées en latence III négatives. Selon Johansson et ses collaborateurs, la voie de signalisation de p38 augmente l'oncoprotéine majeure de l'EBV, LMP1 (Johansson et al., 2010). Morris et al ont mis en évidence que LMP1 peut moduler l'adhésion cellulaire, en régulant la signalisation de l'activine A, de TGF- β et de TGF- β 1 (Morris et al., 2016). L'activine A et le TGF- β 1 sont toutes les deux requises pour la capacité de LMP1 à induire l'expression de la protéine de la matrice extracellulaire, la fibronectine. Les auteurs ont montré que LMP1, par l'intermédiaire de TGF- β 1, contribue au potentiel métastatique des cellules épithéliales dans la pathogenèse du NPC (Morris et al.,

2016). Ces résultats pourraient être étendus aux lymphoproliférations en latence III de l'EBV, LMP1 étant exprimée dans cette phase de latence. Il serait donc intéressant de voir si la forme activée de P38 régule positivement l'expression transcriptionnelle de TGF- β 1.

D'autres voies de signalisation détournées par le programme de latence III pourraient également induire l'expression de TGF- β 1. Les voies de signalisation de PI3K/Akt, JNK et STAT-1, 2, 3 et 5a jouent un rôle dans l'oncogénicité des cellules en latence III de l'EBV.

A ce jour, aucune étude n'a rapporté que ces voies de signalisation étaient des régulateurs positifs de TGF- β 1 dans les lymphoproliférations liées à l'EBV. Cependant, des études menées sur d'autres types cellulaires ont permis d'identifier que ces voies de signalisation pouvaient être des régulateurs positifs de l'expression transcriptionnelle de TGF- β 1.

Bankin et al ont identifié que le TGF- β 1 exogène induit la phosphorylation de Akt à la sérine 473 et l'activité kinase de Akt *in vitro* rapidement dans des cellules mammaires épithéliales, ce qui favorise les jonctions cellulaires et la modification de la morphologie des cellules (Bakin et al., 2000). Selon les auteurs, la voie de signalisation de PI3K/Akt est nécessaire pour l'induction de la transcription de TGF- β 1, la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), et l'invasion cellulaire par des cellules issues de cancer du sein (Bakin et al., 2000).

Santibañez et al ont montré que la voie de signalisation de JNK médie la transition épithélio-mésenchymateuse induite par TGF- β 1, en stimulant les propriétés malignes des kératinocytes transformés dans un modèle murin (Santibañez, 2006). TGF- β 1 induit la phosphorylation de JNK, la transactivation de c-Jun et l'activation d'AP-1 pour induire les étapes initiales de la TEM et la migration des cellules cancéreuses (Santibañez, 2006).

Concernant les STATs, Liu et ses collaborateurs ont montré que la voie de signalisation de JAK/STAT3 joue un rôle dans la TEM, la migration et l'invasion cellulaire induite par TGF- β 1 dans des cellules issues de cancer du poumon (Liu et al., 2014b). JAK/STAT3 agit via une régulation positive de l'expression de phospho-Smad3 (p-Smad3) et de Snail. La signalisation d'IL-6/JAK/STAT3 et TGF- β /Smad synergisent la TEM dans les carcinomes pulmonaires (Liu et al., 2014b).

Il serait intéressant d'inhiber ces différentes voies de signalisation dans les cellules en latence III de l'EBV, qui apparaissent comme des régulateurs positifs de TGF- β 1 dans des pathologies de type tumoral non associées au virus.

Chapitre IV : Discussion générale, perspectives et conclusions

I/ Discussion générale et perspectives

Nous avons mis en évidence dans ce travail que les cellules B immortalisées par l'EBV en latence III possèdent les mêmes caractéristiques phénotypiques et les fonctions suppressives que les Bregs immatures. Nous montrons que les cellules B en latence III peuvent inhiber la prolifération des lymphocytes T autologues, et induire l'expansion de lymphocytes T régulateurs CD4⁺ FoxP3^{High}. Cette expansion de Tregs CD4⁺ FoxP3^{High} est médiée par l'axe PD-1/PD-L1.

Ce travail a permis d'identifier un nouveau mécanisme de détournement du système immunitaire par l'EBV. Le fait que les cellules B en latence III de l'EBV puissent mimer phénotypiquement et fonctionnellement les Bregs permet de comprendre comment l'EBV peut induire des lymphoproliférations chez les hôtes immunocompétents, en inhibant les capacités du système immunitaire de l'hôte à détruire les cellules B infectées.

Durant cette discussion, plusieurs points majeurs de l'étude seront mis en avant et corrélés avec des études réalisées au préalable. Les perspectives pour ce projet seront discutées.

I.1. Primo infection par l'EBV et lymphocytes B régulateurs

Nous montrons dans ce travail que les cellules B en latence III de l'EBV s'apparentent aux niveaux phénotypique et fonctionnel à des Bregs *in vitro* et *ex vivo*. Les cellules immortalisées par l'EBV lors de la primo-infection de l'EBV, la MNI, se trouvent en programme de latence III. Il serait intéressant de voir si les cellules B des patients atteints de la MNI ont un phénotype de Bregs immatures, ou un autre sous-type de Breg humain. Nous pourrions également rechercher dans le sang périphérique de ces patients si nous identifions un pourcentage de Tregs FoxP3⁺ plus élevé que pour les individus ne présentant pas de signes cliniques de la MNI. Cette perspective se heurte à certaines limites éthiques. Il est possible de recueillir des reliquats d'échantillons de patients ayant effectué une prise de sang après leur consentement averti. Toutefois, il est un peu compliqué de mettre en place une récolte d'échantillons sanguins de patients ayant une MNI de manière régulière.

I.2. LMP1 au cœur des processus oncogéniques

LMP1 est l'oncoprotéine majeure de l'EBV. Cette protéine mime la signalisation de CD40 (Uchida et al., 1999), ce qui entraîne la synthèse des protéines TRAFs, activant les voies de signalisation de NF- κ B, P28 et JNK. LMP1 et son mimétisme pour CD40 permettent d'activer les voies de prolifération et de survie des lymphocytes B immortalisés par le virus (Soni et al., 2007).

LMP1 est exprimée par de nombreuses tumeurs malignes humaines, où elle peut jouer un rôle causal. Lorsque les patients sont immunodéprimés des lymphocytes T, LMP1 est fréquemment exprimée dans les cellules B des patients atteints de troubles lymphoprolifératifs, tels que les PTLDs ou les lymphomes des patients atteints par le virus du SIDA (Cesarman, 2011). L'EBV et LMP1 sont également fréquemment détectés dans les DLBCLs chez les personnes âgées, dont le système immunitaire est moins compétent (Castillo et al., 2011). Malgré le succès du traitement antirétroviral pour le virus du VIH, le risque de lymphomes Hodgkiniens liés à l'EBV chez les personnes atteintes du SIDA n'a pas diminué (Jacobson and Abramson, 2012).

Chez les hôtes immunodéprimés et immunocompétents, LMP1 est fréquemment retrouvée dans les cellules malignes de Reed-Sternberg du lymphome de Hodgkin (Fields et al., 2007; Jarrett, 2002; Vockerodt et al., 2008).

Chez les hôtes immunocompétents, LMP1 est exprimée dans un sous-ensemble de carcinomes nasopharyngés anaplasiques (Raab-Traub, 2002; Dawson et al., 2012). Le NPC est l'une des tumeurs malignes associées à l'EBV la plus répandue, ayant une prévalence plus importante dans le sud de la Chine, dans le sud-est de l'Asie et au nord de l'Afrique (Bei et al., 2012). L'EBV sous sa forme latente est retrouvé dans environ 10% des cancers gastriques dans le monde. Toutefois, l'expression de LMP1 n'est pas retrouvée systématiquement dans ce type de cancers (Strong et al., 2013).

Fang et al ont prouvé que LMP1 induit la surexpression de PD-L1 par le biais des voies de signalisation de STAT3, AP-1 et NF- κ B dans les cellules issues de NPC (Fang et al., 2014). Ils montrent que l'IFN- γ synergise avec LMP1 pour augmenter l'expression de PD-L1 et que des niveaux élevés de PD-L1 sont associés à une mauvaise survie globale des patients (Fang et al., 2014). LMP1 induit également l'expression de l'IL-10 dans différentes lymphoproliférations liées à l'EBV (Nakagomi et al., 1994; Herbst et al., 1996; Bi et al., 2016b).

Au vue de l'ensemble de ces données, nous voudrions également savoir si nos résultats obtenus pour les cellules en latence III de l'EBV pourraient s'appliquer aux cellules en latence II, LMP1 étant exprimée durant cette phase. Il serait intéressant d'interroger les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles de lignées cellulaires en latence II, afin de voir si elles pourraient également mimer le rôle des Bregs. Etant donné que LMP1 induit la surexpression des deux molécules phares des Bregs, il est possible que les cellules en latence II possèdent les caractéristiques suppressives majeures des Bregs.

I.3. Equilibre entre cytokines immunosuppressives et pro-inflammatoires

Nous avons constaté que toutes les cellules des lignées en latence III de l'EBV surexpriment aux niveaux transcriptionnel et sécrétoire les molécules immunosuppressives des Bregs, l'IL-10, le TGF- β 1 et les deux sous-unités de l'IL-35. Il serait intéressant par la suite d'étudier l'expression de certaines cytokines pro-inflammatoires, afin de voir l'éventuel équilibre entre les cytokines pro- et anti-inflammatoires. Ansari et *al* ont montré que tous les types de latence de l'EBV entraînent une induction massive de l'expression des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β , IL-18 et IL-33. Ils ont également observé une activation de l'inflammasome, caractérisée par le clivage de la caspase-1 (Ansari et al., 2013).

Nous pouvons nous demander pourquoi l'EBV sécrète à la fois des cytokines pro- et anti-inflammatoires. Waldman ont montré que l'augmentation des niveaux des cytokines pro-inflammatoires IL-6 et TNF- α est prédictive d'un mauvais pronostic pour les patients atteints de maladies cardiovasculaires. Les facteurs sous-jacents à cette augmentation sont multiples et peuvent inclure des herpèsvirus latents, tel que l'EBV qui peut être réactivé en cas de stress (Waldman et al., 2008). Leurs travaux antérieurs ont mis en évidence que la déoxyuridine triphosphate nucléotidohydrolase (dUTPase), une protéine synthétisée dans les phases précoces de la réplication virale, peut induire les macrophages et les monocytes humains à produire l'IL-6 et le TNF- α (Glaser et al., 2006). L'équipe de Bennett et *al* a également démontré que l'inflammation est liée à la réactivation des herpèsvirus latents, en particulier chez les personnes âgées (Bennett et al., 2012). Nous pourrions donc imaginer que le virus peut sécréter les cytokines pro- ou anti-inflammatoires à différents moments de son cycle (latence/réactivation). Il serait intéressant de rechercher s'il y a une évolution dans l'équilibre entre ces deux types de cytokines lorsque l'EBV est réactivé. La thèse soutenue au laboratoire par Al Mohamad H. a permis d'identifier que le traitement par le vorinostat, un inhibiteur des histones désactéylase (HDACi), peut induire la réactivation de l'EBV sur les lignées P3HR1

et B95.8. Il serait possible de mesurer les niveaux des cytokines pro-inflammatoires de l'EBV avant et après traitement au vorinostat.

Dans le cas de notre étude, nous pourrions imaginer que les cellules en latence III de l'EBV sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires, au profit des anti-inflammatoires afin de ne pas être réactivées.

I.4. Différents types de Bregs et cellules B en latence III de l'EBV, quels facteurs transcriptionnels ?

Nous montrons que les cellules B immortalisées par l'EBV en latence III s'apparentent phénotypiquement et fonctionnellement aux Bregs de type immature (CD24^{High} CD38^{High} PD-L1^{High}). PD-L1 est uniquement exprimé dans ce sous-type de Breg humain. Les Bregs immatures induisent l'expansion de lymphocytes T régulateurs, et limitent la différenciation des cellules T helpers (Th) (Flores-Borja et al., 2013), données que nous montrons également dans nos travaux. Les mécanismes d'action suppresseurs des Bregs sont majoritairement orchestrés par l'IL-10 pour tous les sous-types de Bregs humains (Mauri and Menon, 2015a). Il apparaît que d'autres mécanismes suppressifs sont caractéristiques de certains sous-types : PD-L1 pour les Bregs immatures, GrB et IDO pour les cellules B GrB⁺, IgG4 pour les cellules Br1, l'adénosine pour les Bregs CD39⁺ CD73⁺ et TGF- β 1/IDO pour les iBregs. Les iBregs sont des Bregs induites qui utilisent le TGF- β 1 et l'IDO pour différencier les lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ en lymphocytes T régulateurs producteurs de TGF- β et d'IL-10 (Nouël et al., 2015).

Etant donné que les cellules B en latence III de l'EBV surexpriment TGF- β 1, il se pourrait que ces cellules constituent un mélange entre des Bregs immatures et des iBregs. Pour s'affranchir de cette hypothèse, il serait intéressant de vérifier si les cellules B immortalisées par l'EBV en latence III sécrètent l'enzyme IDO, comme l'ont montré Song et son équipe (Song et al., 2011).

Le facteur de transcription FoxP3 permet, conjointement à d'autres marqueurs, d'identifier les cellules T régulatrices (Rudensky, 2011). Contrairement aux Tregs, aucun facteur de transcription spécifique des Bregs n'a été identifié à ce jour (Mauri and Menon, 2015a; Rosser and Mauri, 2015).

NF- κ B et STAT3 apparaissent comme des facteurs de transcription jouant des rôles cruciaux dans l'émergence des cancers (Grivennikov and Karin, 2010). Nos résultats ont identifié que

NF- κ B pouvait être un régulateur positif de l'expression transcriptionnelle des trois cytokines majeures des Bregs. Selon Liu et *al*, l'activation de STAT3 est un des facteurs essentiels à la sécrétion de l'IL-10 par les cellules B humaines (Liu et al., 2014a). Nous nous posons la question de la conjonction de NF- κ B et STAT3 dans la physiologie des cellules B régulatrices. L'étude des gènes cibles de ces deux facteurs transcriptionnels dans les différents sous-types de Bregs décrits pourrait peut-être apporter des connaissances supplémentaires sur l'origine et l'unité des Bregs.

I.5. Expansion des lymphocytes T régulateurs médiée par l'axe PD-1/PD-L1

Nous avons identifié que les cellules B en latence III de l'EBV peuvent induire l'expansion de Tregs lorsqu'elles sont incubées avec les lymphocytes T autologues, par l'intermédiaire de l'axe PD-1/PD-L1. Nous remarquons que les Tregs induits par les cellules B immortalisées en latence III sont majoritairement des Tregs inductibles (iTregs, CD4⁺ CD25⁻ FoxP3^{High}), avec une plus faible proportion de Tregs provenant du thymus (nTregs, CD4⁺ CD25⁺ FoxP3^{High}). Ces données sont en cohérence avec les travaux de Francisco et *al*, qui ont montré que PD-L1 est un régulateur majeur du développement, du maintien et de la fonction des iTregs (Francisco et al., 2009). Ils ont identifié que PD-L1 peut inhiber les réponses des lymphocytes T en promouvant l'induction et le maintien des iTregs (Francisco et al., 2009). Nous avons confirmé que l'axe PD-1/PD-L1 joue un rôle important dans l'induction des iTregs. L'axe PD-1/PD-L1 et les Tregs sont également décrits dans diverses tumeurs, telles que le cancer du sein (Li et al., 2016; Guan et al., 2016a), et du poumon (Shi, 2016).

Par ailleurs, une des questions principales serait de savoir si les Tregs induits par le contact avec les cellules B en latence III de l'EBV sont spécifiques du virus. La section I.7 discutera plus précisément de cet aspect.

I.6. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T autologues

Selon Francisco et *al*, PD-L1 peut inhiber les réponses T effecteurs au profit de l'expansion des Tregs (Francisco et al., 2009). Nous avons prouvé que les cellules B en latence III de l'EBV induisent la différenciation des Tregs par l'axe PD-1/PD-L1, mais nos résultats montrent que cet axe n'est pas impliqué dans l'inhibition de la prolifération des T CD4⁺ et CD8⁺. En effet, l'inhibition de PD-L1 ne restaure pas la prolifération des

lymphocytes T autologues lorsqu'ils sont co-incubés avec les cellules B en latence III de l'EBV (données non montrées). D'autres facteurs seraient à l'origine de l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs. L'IL-10 est une cytokine immunosuppressive qui peut inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ activés, et supprimer la prolifération et la fonction cytotoxique des lymphocytes T CD8⁺ (Ye et al., 2007). En inhibant l'IL-10 par un anticorps bloquant, nous ne sommes pas parvenus à restaurer l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ médiée par les cellules B autologues en latence III de l'EBV. Cette inhibition pourrait être due à une privation des lymphocytes T en adénosine, qui diminue leur prolifération (Linden and Cekic, 2012). Les ectonucléotidases CD39 et CD73 peuvent convertir l'ATP en AMP et en adénosine, qui se lie ensuite au récepteur à l'adénosine A2a sur les lymphocytes T effecteurs, afin d'inhiber leurs fonctions. De plus, les Tregs expriment des niveaux élevés de CD39 et CD73 (Mandapathil et al., 2010). Nous pourrions mesurer l'expression de ces deux ectonucléotidases à la surface des cellules B en latence III de l'EBV, afin de voir si l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T autologues serait due à une conversion de l'ATP en adénosine. Si c'est le cas, nous pouvons supposer que l'inhibition de la prolifération des T effecteurs est due à (i) une conversion de l'ATP en AMP et en adénosine par CD39 et CD73, qui réprime leurs fonctions effectrices (ii) la surexpression de CD39 et CD73 à la surface des Tregs induits par les cellules B autologues en latence III de l'EBV, qui inhiberait également la prolifération des lymphocytes T effecteurs.

Hormis leurs capacités d'inhibition de la prolifération des lymphocytes T effecteurs autologues au profit des Tregs, les Bregs possèdent d'autres propriétés fonctionnelles. Par l'intermédiaire de l'IL-10, de TGF- β et de l'IL-35, les Bregs peuvent inhiber les cellules dendritiques, les monocytes, et favoriser le maintien NKT invariants (iNKT) (Rosser and Mauri, 2015). Il serait intéressant d'observer si les lignées en latence III de l'EBV possèdent l'ensemble des propriétés fonctionnelles des Bregs.

I.7. Lymphocytes T autologues spécifiques de l'EBV ?

Un des questionnements majeurs de cette étude qu'il reste à élucider est de savoir si les réponses lymphocytaires T observées sont spécifiques de l'EBV. Nous avons constaté que les cellules B en latence III de l'EBV pouvaient inhiber de manière globale la prolifération des lymphocytes T autologues CD4 et CD8. Nous aimerions connaître le rôle exact de l'EBV dans l'inhibition des lymphocytes T. D'autre part, nous souhaiterions également identifier si

les lymphocytes T régulateurs FoxP3⁺ induits par les cellules B en latence III de l'EBV sont spécifiques du virus.

Il serait envisageable de commander des peptides qui miment les protéines de latence de l'EBV, ainsi que les tétramères correspondant couplés à un fluorochrome. Ainsi, les réponses T spécifiques de l'EBV pourraient être visualisées par cytométrie en flux et nous pourrions déterminer le rôle précis du virus dans les réponses lymphocytaires T CD4 et CD8.

La méthodologie consiste à incuber les peptides spécifiques de l'EBV lors des expériences entre lymphocytes B et T autologues, ainsi que les tétramères restreints au CMH-I (correspondant au lymphocytes T CD8 anti-EBV) ou au CHM-II (lymphocytes T CD4 anti-EBV). La streptavidine du tétramère est couplé à un fluorochrome, et permet d'identifier les réponses T spécifiques de l'EBV. La **Figure 33** schématise la méthode d'identification de lymphocytes T CD8 spécifiques de l'EBV.

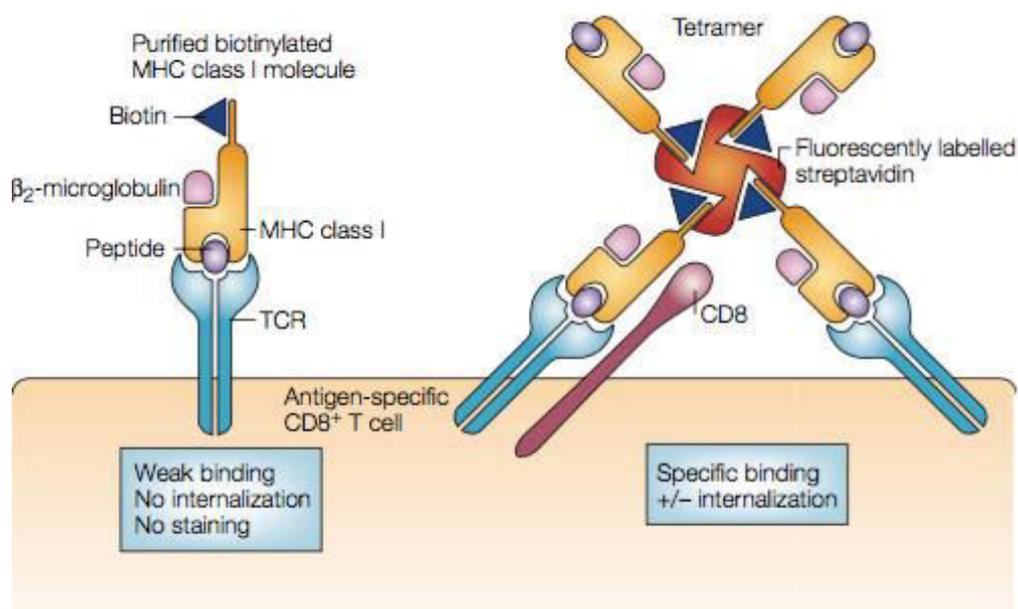


Figure 33 : Schéma représentant la méthode de détection des lymphocytes T CD8 spécifiques de l'EBV.

D'après (Klenerman et al., 2002, revue).

I.8. Place des Bregs dans les infections virales chroniques

Les Bregs ont été décrites dans d'autres infections virales chroniques, chez les patients atteints du SIDA, de l'hépatite B (HBV) et de l'hépatite C (HCV). L'infection par le virus du SIDA est associée à une augmentation de l'IL-10 et de PD-L1, et les marqueurs de la

progression de la maladie sont corrélés à une augmentation des Bregs (Siewe et al., 2013). Les Bregs atténuent les fonctions cytotoxiques des lymphocytes T CD8+ *in vitro*, par l'intermédiaire de l'IL-10 (Siewe et al., 2013). Das et al ont montré que les cellules B régulatrices productrices d'IL-10 jouent un rôle dans l'infection chronique par l'HBV (Das et al., 2012). Ils ont constaté qu'il s'agissait principalement de Bregs de type immature (CD19⁺ CD24^{High} CD38^{High}), et que la fraction purifiée de ces Bregs peut supprimer les réponses T CD8 anti-HBV, par l'intermédiaire de l'IL-10 (Das et al., 2012). Yun Liu et son équipe ont identifié que les Bregs productrices d'IL-10 suppriment les réponses des lymphocytes T effecteurs, et induisent l'expansion des Tregs durant l'infection chronique par l'HBV (Liu et al., 2016a).

Eiza et ses collaborateurs montrent que l'augmentation de Bregs et de Tregs durant l'infection par l'HCV est associée à la persistance virale (Eiza et al., 2016).

Nos travaux concernant la persistance virale de l'EBV tout au long de la vie de l'hôte s'apparentent aux études menées au préalable sur des virus produisant des infections chroniques. Ces résultats permettent de mieux caractériser comment l'EBV parvient à échapper au système immunitaire de l'hôte, comme certains autres virus persistant dans l'organisme. La détection de lymphocytes B régulateurs dans le sang des patients pourrait être un élément prédictif d'infections virales chroniques.

I.9. Homologie des cellules B en latence III de l'EBV avec les Bregs dans un contexte tumoral

Nous avons démontré que les cellules B en latence III de l'EBV sont capables d'inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8 autologues, et d'induire l'expansion de Tregs FoxP3⁺ *ex vivo*. Pour aller plus loin dans nos recherches et pour comprendre une des manières dont l'EBV détourne le système immunitaire de l'hôte, il serait judicieux de vérifier ce concept au niveau tumoral.

Nous avons pour objectif d'injecter en sous-cutané des cellules B en latence III de l'EBV dont les lignées ont été récemment établies (C0401, J1209, N2803) en sous-cutané dans des souris immunodéprimées. Ce type d'expérience a déjà été effectué au préalable au laboratoire avec les lignées de lymphomes de Burkitt BL2B95.8 et BL41B95.8 et avaient conduit à l'apparition de tumeurs en quelques semaines. Nous aimerions étudier les tumeurs issues des cellules B en latence III, en comparaison avec des lignées non infectées par l'EBV ou dans un autre type de latence. Nous pourrions effectuer un marquage en

immunohistochimie ou en microscopie confocale pour détecter d'éventuels Bregs de type immature au niveau des tumeurs. Ces données pourraient nous fournir une autre preuve physiologique de l'homologie des cellules B en latence III de l'EBV et des Bregs.

L'expression de PD-L1 est augmentée dans divers lymphomes EBV-positifs, dont les PTLDs où l'EBV est causal dans l'émergence de cette pathologie et dont les cellules sont en programme de latence III (Green et al., 2012; Ilcus et al., 2017). Dans la même démarche que pour les patients atteints de la MNI, il serait intéressant de savoir si les cellules B issues des patients atteints de PTLD s'apparentent aux niveaux phénotypique et fonctionnel à des cellules B régulatrices.

Nous sommes actuellement en train d'établir une collaboration avec Marie-Cécile PARRENS, exerçant au service de pathologie du CHU de Bordeaux, afin de recueillir des tumeurs de patients atteints de lymphoproliférations liées à l'EBV. Nous souhaiterions effectuer des coupes de ces tumeurs, ainsi qu'un marquage PD-L1 et FoxP3 en immunohistochimie. Cette perspective de travail nous apporterait des informations essentielles pour confirmer ou infirmer les résultats de ma thèse obtenus *in vitro* et *ex vivo*.

Plus largement, le lymphome B diffus à grandes cellules de type ABC (Activated B-Cell) est la forme la plus agressive de ce type de lymphome. Il est résistant à la plupart des chimiothérapies classiques existantes (Young et al., 2015). Les deux programmes de transcription majeurs détournés dans les ABC-DLBCLs sont STAT3 et NF- κ B (Lam et al., 2008; Ok et al., 2014). Plusieurs études ont mis en évidence que PD-L1 est surexprimé à la surface des cellules issues de DLBCL, et est associé à une mauvaise survie globale des patients (Kiyasu et al., 2015; Georgiou et al., 2016). Dans un tel contexte, nous nous demandons si les cellules issues des ABC-DLBCLs pourraient être apparentées phénotypiquement et fonctionnellement à des cellules B régulatrices.

II/ Conclusion

Le but de ma thèse était d'étudier les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules B en latence III de l'EBV, dans le cadre des propriétés des Bregs. Nous avons pu identifier que les cellules B immortalisées par l'EBV possèdent les déterminants antigéniques des Bregs de type immature, surexprimant les marqueurs CD24, CD38 et PD-L1/B7-H1/CD274. Les cellules B en latence III de l'EBV surexpriment aux niveaux transcriptionnel et sécrétoire les trois cytokines immunosuppressives cardinales des Bregs : l'IL-10, le TGF- β 1 et les deux sous-unités de l'IL-35 (*EBI3* et *IL12A* codant pour les protéines IL-27 β et IL-12 α , respectivement). Nous nous sommes intéressés aux propriétés fonctionnelles des cellules B en latence III de l'EBV par rapport aux caractéristiques des Bregs : leur capacité à inhiber les réponses des lymphocytes T effecteurs, et à induire l'expansion de lymphocytes T régulateurs.

Nous avons prouvé que les cellules B en latence III de l'EBV sont capables d'induire l'apoptose des lymphocytes T4 autologues, d'inhiber la prolifération globale des lymphocytes T CD4 et CD8, et d'induire l'expansion de Tregs CD4⁺ FoxP3^{High}. Nous montrons que cette expansion de Tregs par les cellules B immortalisées par l'EBV est médiée par l'axe PD-1/PD-L1.

Grâce à ce travail, nous avons identifié un des aspects des mécanismes d'échappement au système immunitaire par l'EBV. Les cellules immortalisées peuvent mimer les cellules B régulatrices, qui inhibent les réponses immunitaires spécifiques au virus et expandent les populations de Tregs. Cette acquisition d'un phénotype régulateur permet d'augmenter les capacités oncogéniques du virus, et de détourner le système immunitaire de l'hôte. Ces résultats sont illustrés sur la **Figure 34**.

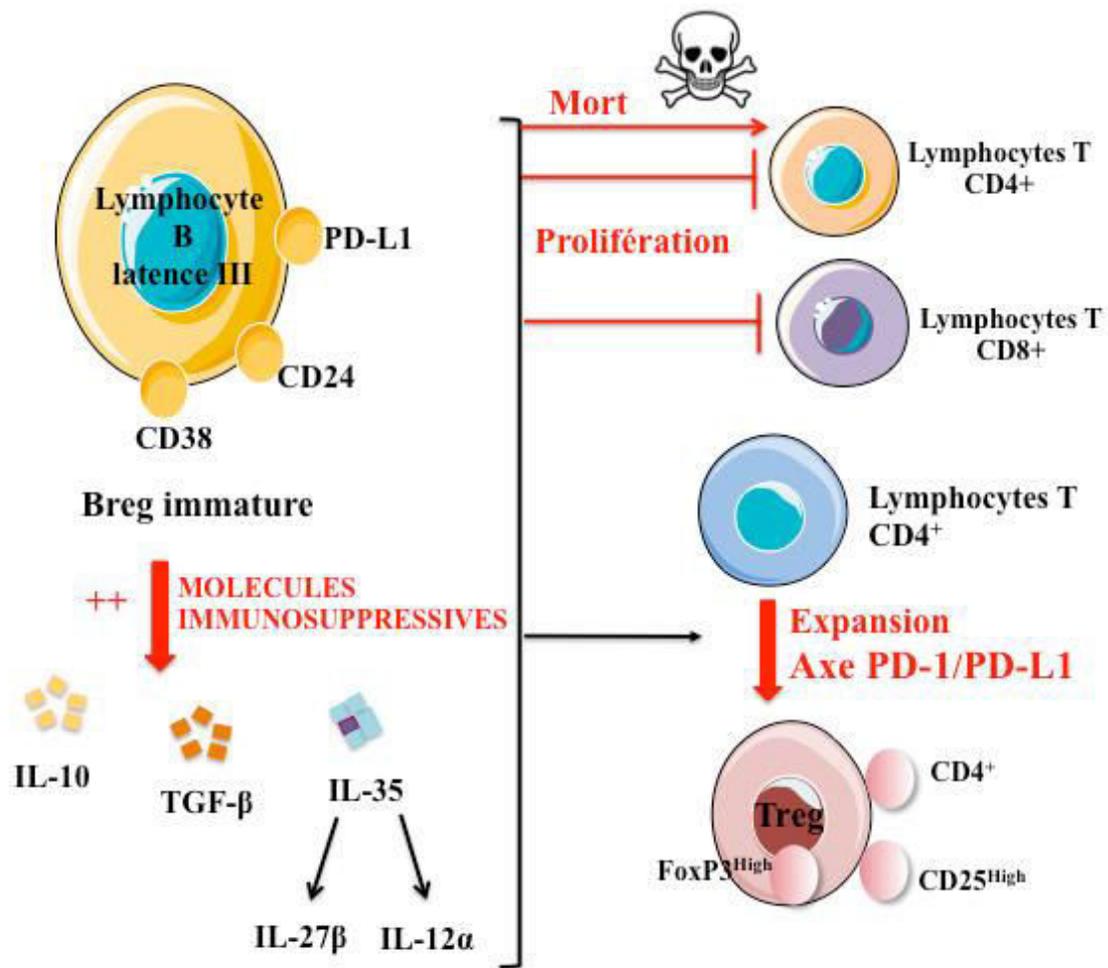


Figure 34 : Schéma récapitulatif des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules B en latence III de l'EBV.

Références bibliographiques

- Abdollahpour, H., G. Appaswamy, D. Kotlarz, J. Diestelhorst, R. Beier, A.A. Schäffer, E.M. Gertz, A. Schambach, H.H. Kreipe, D. Pfeifer, K.R. Engelhardt, N. Rezaei, B. Grimbacher, S. Lohrmann, R. Sherkat, and C. Klein. 2012. The phenotype of human STK4 deficiency. *Blood*. 119:3450–3457. doi:10.1182/blood-2011-09-378158.
- Aga, M., G.L. Bentz, S. Raffa, M.R. Torrisi, S. Kondo, N. Wakisaka, T. Yoshizaki, J.S. Pagano, and J. Shackelford. 2014. Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene*. 33:4613–4622. doi:10.1038/onc.2014.66.
- Aguilar, C., and S. Latour. 2015. X-linked inhibitor of apoptosis protein deficiency: more than an X-linked lymphoproliferative syndrome. *J. Clin. Immunol.* 35:331–338. doi:10.1007/s10875-015-0141-9.
- Ahangarani, R.R., W. Janssens, L. VanderElst, V. Carlier, T. VandenDriessche, M. Chuah, B. Weynand, J.A.J. Vanoirbeek, M. Jacquemin, and J.-M. Saint-Remy. 2009. In vivo induction of type 1-like regulatory T cells using genetically modified B cells confers long-term IL-10-dependent antigen-specific unresponsiveness. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 183:8232–8243. doi:10.4049/jimmunol.0901777.
- Ahmed, W., P.S. Philip, S. Attoub, and G. Khan. 2015. Epstein-Barr virus-infected cells release Fas ligand in exosomal fractions and induce apoptosis in recipient cells via the extrinsic pathway. *J. Gen. Virol.* 96:3646–3659. doi:10.1099/jgv.0.000313.
- Ahmed, W., P.S. Philip, S. Tariq, and G. Khan. 2014. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) are present in fractions related to exosomes released by EBV-transformed cells. *PLoS One*. 9:e99163. doi:10.1371/journal.pone.0099163.
- Akdis, C.A., and M. Akdis. 2009. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 123:735-746; quiz 747-748. doi:10.1016/j.jaci.2009.02.030.
- Albanese, M., T. Tagawa, M. Bouvet, L. Maliqi, D. Lutter, J. Hoser, M. Hastreiter, M. Hayes, B. Sugden, L. Martin, A. Moosmann, and W. Hammerschmidt. 2016. Epstein-Barr virus microRNAs reduce immune surveillance by virus-specific CD8⁺ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113:E6467–E6475. doi:10.1073/pnas.1605884113.
- Alkhairy, O.K., R. Perez-Becker, G.J. Driessen, H. Abolhassani, J. van Montfrans, S. Borte, S. Choo, N. Wang, K. Tesselaar, M. Fang, K. Bienemann, K. Boztug, A. Daneva, F. Mechinaud, T. Wiesel, C. Becker, G. Dücker, K. Siepermann, M.C. van Zelm, N. Rezaei, M.

- van der Burg, A. Aghamohammadi, M.G. Seidel, T. Niehues, and L. Hammarström. 2015. Novel mutations in TNFRSF7/CD27: Clinical, immunologic, and genetic characterization of human CD27 deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136:703–712.e10. doi:10.1016/j.jaci.2015.02.022.
- Allday, M.J., Q. Bazot, and R.E. White. 2015. The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 391:61–117. doi:10.1007/978-3-319-22834-1_3.
- Altmann, M., D. Pich, R. Ruiss, J. Wang, B. Sugden, and W. Hammerschmidt. 2006. Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14188–14193. doi:10.1073/pnas.0605985103.
- Amagai, M. 1996. Pemphigus: autoimmunity to epidermal cell adhesion molecules. *Adv. Dermatol.* 11:319–352; discussion 353.
- Amarnath, S., C.W. Mangus, J.C.M. Wang, F. Wei, A. He, V. Kapoor, J.E. Foley, P.R. Massey, T.C. Felizardo, J.L. Riley, B.L. Levine, C.H. June, J.A. Medin, and D.H. Fowler. 2011. The PDL1-PD1 Axis Converts Human Th1 Cells Into Regulatory T Cells. *Sci. Transl. Med.* 3:111ra120. doi:10.1126/scitranslmed.3003130.
- Ambinder, R.F. 2001. Epstein-Barr virus associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990.* 37:1209–1216.
- Amu, S., S.P. Saunders, M. Kronenberg, N.E. Mangan, A. Atzberger, and P.G. Fallon. 2010. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FoxP3-positive T regulatory cells in a murine model. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125:1114–1124.e8. doi:10.1016/j.jaci.2010.01.018.
- Amyes, E., C. Hatton, D. Montamat-Sicotte, N. Gudgeon, A.B. Rickinson, A.J. McMichael, and M.F.C. Callan. 2003. Characterization of the CD4+ T cell response to Epstein-Barr virus during primary and persistent infection. *J. Exp. Med.* 198:903–911. doi:10.1084/jem.20022058.
- Anderton, E., J. Yee, P. Smith, T. Crook, R.E. White, and M.J. Allday. 2008. Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene.* 27:421–433. doi:10.1038/sj.onc.1210668.
- Angelotti, F., A. Parma, G. Cafaro, R. Capecchi, A. Alunno, and I. Puxeddu. 2017. One year in review 2017: pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35:368–378.

- Ankita, G., and D. Shashi. 2016. Pulmonary Lymphomatoid Granulomatosis- a Case Report with Review of Literature. *Indian J. Surg. Oncol.* 7:484–487. doi:10.1007/s13193-016-0525-1.
- Ansari, M.A., V.V. Singh, S. Dutta, M.V. Veettil, D. Dutta, L. Chikoti, J. Lu, D. Everly, and B. Chandran. 2013. Constitutive interferon-inducible protein 16-inflammasome activation during Epstein-Barr virus latency I, II, and III in B and epithelial cells. *J. Virol.* 87:8606–8623. doi:10.1128/JVI.00805-13.
- Ansary, M.M.U., S. Ishihara, A. Oka, R. Kusunoki, N. Oshima, T. Yuki, K. Kawashima, H. Maegawa, N. Kashiwagi, and Y. Kinoshita. 2014. Apoptotic cells ameliorate chronic intestinal inflammation by enhancing regulatory B-cell function. *Inflamm. Bowel Dis.* 20:2308–2320. doi:10.1097/MIB.0000000000000240.
- Aozasa, K. 2006. Pyothorax-associated lymphoma. *J. Clin. Exp. Hematop. JCEH.* 46:5–10.
- Apostolou, I., and H. von Boehmer. 2004. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J. Exp. Med.* 199:1401–1408. doi:10.1084/jem.20040249.
- Arcipowski, K.M., and G.A. Bishop. 2012. TRAF binding is required for a distinct subset of in vivo B cell functions of the oncoprotein LMP1. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 189:5165–5170. doi:10.4049/jimmunol.1201821.
- Baban, B., P.R. Chandler, M.D. Sharma, J. Pihkala, P.A. Koni, D.H. Munn, and A.L. Mellor. 2009. IDO Activates Regulatory T Cells and Blocks Their Conversion into Th17-Like T Cells. *J. Immunol.* 183:2475–2483. doi:10.4049/jimmunol.0900986.
- Babcock, G.J., D. Hochberg, and A.D. Thorley-Lawson. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity.* 13:497–506.
- Badolato, R., and S. Parolini. 2007. Novel insights from adaptor protein 3 complex deficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.* 120:735-741; quiz 742-743. doi:10.1016/j.jaci.2007.08.039.
- Baer, R., A.T. Bankier, M.D. Biggin, P.L. Deininger, P.J. Farrell, T.J. Gibson, G. Hatfull, G.S. Hudson, S.C. Satchwell, and C. Séguin. 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature.* 310:207–211.
- Bakin, A.V., A.K. Tomlinson, N.A. Bhowmick, H.L. Moses, and C.L. Arteaga. 2000. Phosphatidylinositol 3-Kinase Function Is Required for Transforming Growth Factor β -mediated Epithelial to Mesenchymal Transition and Cell Migration. *J. Biol. Chem.* 275:36803–36810. doi:10.1074/jbc.M005912200.

- Bankó, Z., J. Pozsgay, D. Szili, M. Tóth, T. Gáti, G. Nagy, B. Rojkovich, and G. Sármay. 2017. Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 198:1512–1520. doi:10.4049/jimmunol.1600218.
- Barbosa, M.D., Q.A. Nguyen, V.T. Tchernev, J.A. Ashley, J.C. Detter, S.M. Blaydes, S.J. Brandt, D. Chotai, C. Hodgman, R.C. Solari, M. Lovett, and S.F. Kingsmore. 1996. Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes. *Nature.* 382:262–265. doi:10.1038/382262a0.
- Basgoz, N., and J.K. Preiksaitis. 1995. Post-transplant lymphoproliferative disorder. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 9:901–923.
- Bayraktar, S., U.D. Bayraktar, J.C. Ramos, A. Stefanovic, and I.S. Lossos. 2011. Primary CNS lymphoma in HIV positive and negative patients: comparison of clinical characteristics, outcome and prognostic factors. *J. Neurooncol.* 101:257–265. doi:10.1007/s11060-010-0252-3.
- Beatty, P.R., S.M. Krams, and O.M. Martinez. 1997. Involvement of IL-10 in the autonomous growth of EBV-transformed B cell lines. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 158:4045–4051.
- Bei, J.-X., W.-H. Jia, and Y.-X. Zeng. 2012. Familial and large-scale case-control studies identify genes associated with nasopharyngeal carcinoma. *Semin. Cancer Biol.* 22:96–106. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.012.
- Bennett, J.M., R. Glaser, W.B. Malarkey, D.Q. Beversdorf, J. Peng, and J.K. Kiecolt-Glaser. 2012. Inflammation and reactivation of latent herpesviruses in older adults. *Brain. Behav. Immun.* 26:739–746. doi:10.1016/j.bbi.2011.11.007.
- Bernstein, E.D., and D.M. Murasko. 1998. Effect of age on cytokine production in humans. *Age.* 21:137–151. doi:10.1007/s11357-998-0024-6.
- Bi, X.-W., H. Wang, W.-W. Zhang, J.-H. Wang, W.-J. Liu, Z.-J. Xia, H.-Q. Huang, W.-Q. Jiang, Y.-J. Zhang, and L. Wang. 2016a. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- κ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 9:109. doi:10.1186/s13045-016-0341-7.
- Bi, X.-W., H. Wang, W.-W. Zhang, J.-H. Wang, W.-J. Liu, Z.-J. Xia, H.-Q. Huang, W.-Q. Jiang, Y.-J. Zhang, and L. Wang. 2016b. PD-L1 is upregulated by EBV-driven LMP1 through NF- κ B pathway and correlates with poor prognosis in natural killer/T-cell lymphoma. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 9:109. doi:10.1186/s13045-016-0341-7.
- Birkeland, S.A., K. Bendtzen, B. Møller, S. Hamilton-Dutoit, and H.K. Andersen. 1999.

Interleukin-10 and posttransplant lymphoproliferative disorder after kidney transplantation. *Transplantation*. 67:876–881.

Biron, C.A., K.B. Nguyen, G.C. Pien, L.P. Cousens, and T.P. Salazar-Mather. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* 17:189–220. doi:10.1146/annurev.immunol.17.1.189.

Blair, P.A., K.A. Chavez-Rueda, J.G. Evans, M.J. Shlomchik, A. Eddaoudi, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 182:3492–3502. doi:10.4049/jimmunol.0803052.

Blair, P.A., L.Y. Noreña, F. Flores-Borja, D.J. Rawlings, D.A. Isenberg, M.R. Ehrenstein, and C. Mauri. 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*. 32:129–140. doi:10.1016/j.immuni.2009.11.009.

Bloom, B.R., P. Salgame, and B. Diamond. 1992. Revisiting and revising suppressor T cells. *Immunol. Today*. 13:131–136. doi:10.1016/0167-5699(92)90110-S.

Bofill-De Ros, X., M. Rovira-Rigau, and C. Fillat. 2017. Implications of MicroRNAs in Oncolytic Virotherapy. *Front. Oncol.* 7:142. doi:10.3389/fonc.2017.00142.

Booth, C., K.C. Gilmour, P. Veys, A.R. Gennery, M.A. Slatter, H. Chapel, P.T. Heath, C.G. Steward, O. Smith, A. O'Meara, H. Kerrigan, N. Mahlaoui, M. Cavazzana-Calvo, A. Fischer, D. Moshous, S. Blanche, J. Pachlopnik Schmid, J. Pachlopnick-Schmid, S. Latour, G. de Saint-Basile, M. Albert, G. Notheis, N. Rieber, B. Strahm, H. Ritterbusch, A. Lankester, N.G. Hartwig, I. Meyts, A. Plebani, A. Soresina, A. Finocchi, C. Pignata, E. Cirillo, S. Bonanomi, C. Peters, K. Kalwak, S. Pasic, P. Sedlacek, J. Jazbec, H. Kanegane, K.E. Nichols, I.C. Hanson, N. Kapoor, E. Haddad, M. Cowan, S. Choo, J. Smart, P.D. Arkwright, and H.B. Gaspar. 2011. X-linked lymphoproliferative disease due to SAP/SH2D1A deficiency: a multicenter study on the manifestations, management and outcome of the disease. *Blood*. 117:53–62. doi:10.1182/blood-2010-06-284935.

Bornkamm, G.W., J. Hudewentz, U.K. Freese, and U. Zimmer. 1982a. Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J. Virol.* 43:952–968.

Bornkamm, G.W., J. Hudewentz, U.K. Freese, and U. Zimmer. 1982b. Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to

the DSL region. *J. Virol.* 43:952–968.

Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao. 2005. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* 17:275–281. doi:10.1016/j.coi.2005.04.004.

Borza, C.M., A.J. Morgan, S.M. Turk, and L.M. Hutt-Fletcher. 2004. Use of gHgL for attachment of Epstein-Barr virus to epithelial cells compromises infection. *J. Virol.* 78:5007–5014.

Bosma, A., A. Abdel-Gadir, D.A. Isenberg, E.C. Jury, and C. Mauri. 2012. Lipid-antigen presentation by CD1d(+) B cells is essential for the maintenance of invariant natural killer T cells. *Immunity.* 36:477–490. doi:10.1016/j.immuni.2012.02.008.

Bouaziz, J.-D., S. Calbo, M. Maho-Vaillant, A. Saussine, M. Bagot, A. Bensussan, and P. Musette. 2010. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4(+) T-cell activation in vitro. *Eur. J. Immunol.* 40:2686–2691. doi:10.1002/eji.201040673.

Bouaziz, J.-D., K. Yanaba, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.* 224:201–214. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00661.x.

Brockmann, L., N. Gagliani, B. Steglich, A.D. Giannou, J. Kempinski, P. Pelczar, M. Geffken, B. Mfarrej, F. Huber, J. Herkel, Y.Y. Wan, E. Esplugues, M. Battaglia, C.F. Krebs, R.A. Flavell, and S. Huber. 2017. IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 198:1130–1141. doi:10.4049/jimmunol.1601045.

Brogden, K.A., S. Vali, and T. Abbasi. 2016. PD-L1 is a diverse molecule regulating both tumor-intrinsic signaling and adaptive immunosuppression. *Transl. Cancer Res.* 5:S1396–S1399. doi:10.21037/tcr.2016.12.43.

Brunkow, M.E., E.W. Jeffery, K.A. Hjerrild, B. Paepfer, L.B. Clark, S.A. Yasayko, J.E. Wilkinson, D. Galas, S.F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68–73. doi:10.1038/83784.

Burke, A.P., T.S. Yen, K.M. Shekitka, and L.H. Sobin. 1990. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 3:377–380.

Burkitt, D. 1958. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br. J. Surg.* 46:218–223.

Burrows, S.R., J. Gardner, R. Khanna, T. Steward, D.J. Moss, S. Rodda, and A. Suhrbier. 1994. Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J. Gen. Virol.* 75 (Pt 9):2489–2493. doi:10.1099/0022-1317-75-9-2489.

Callan, M.F., C. Fazou, H. Yang, T. Rostron, K. Poon, C. Hatton, and A.J. McMichael. 2000. CD8(+) T-cell selection, function, and death in the primary immune response in vivo. *J. Clin. Invest.* 106:1251–1261. doi:10.1172/JCI10590.

Camilleri-Broët, S., F. Davi, J. Feuillard, C. Bourgeois, D. Seilhean, J.J. Hauw, and M. Raphaël. 1995. High expression of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus and BCL-2 oncoprotein in acquired immunodeficiency syndrome-related primary brain lymphomas. *Blood.* 86:432–435.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2014. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature.* 513:202–209. doi:10.1038/nature13480.

Cannella, S., A. Santoro, G. Bruno, M. Pillon, L. Mussolin, G. Mangili, A. Rosolen, and M. Aricò. 2007. Germline mutations of the perforin gene are a frequent occurrence in childhood anaplastic large cell lymphoma. *Cancer.* 109:2566–2571. doi:10.1002/cncr.22718.

Carter, N.A., R. Vasconcellos, E.C. Rosser, C. Tulone, A. Muñoz-Suano, M. Kamanaka, M.R. Ehrenstein, R.A. Flavell, and C. Mauri. 2011. Mice lacking endogenous IL-10-producing regulatory B cells develop exacerbated disease and present with an increased frequency of Th1/Th17 but a decrease in regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 186:5569–5579. doi:10.4049/jimmunol.1100284.

Castillo, J.J., B.E. Beltran, R.N. Miranda, S. Paydas, E.S. Winer, and J.N. Butera. 2011. Epstein-barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: what we know so far. *The Oncologist.* 16:87–96. doi:10.1634/theoncologist.2010-0213.

Castillo, J.J., B.E. Beltran, R.N. Miranda, K.H. Young, J.C. Chavez, and E.M. Sotomayor. 2016. EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly: 2016 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am. J. Hematol.* 91:529–537. doi:10.1002/ajh.24370.

Casulo, C., and J. Friedberg. 2015. Treating Burkitt Lymphoma in Adults. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* 10:266–271. doi:10.1007/s11899-015-0263-4.

Cesarman, E. 2011. Gammaherpesvirus and lymphoproliferative disorders in immunocompromised patients. *Cancer Lett.* 305:163–174. doi:10.1016/j.canlet.2011.03.003.

Chaigne-Delalande, B., F.-Y. Li, G.M. O'Connor, M.J. Lukacs, P. Jiang, L. Zheng, A. Shatzer, M. Biancalana, S. Pittaluga, H.F. Matthews, T.J. Jancel, J.J. Bleesing, R.A. Marsh, T.W. Kuijpers, K.E. Nichols, C.L. Lucas, S. Nagpal, H. Mehmet, H.C. Su, J.I. Cohen, G. Uzel, and M.J. Lenardo. 2013. Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science.* 341:186–191. doi:10.1126/science.1240094.

Chan, B., A. Lanyi, H.K. Song, J. Griesbach, M. Simarro-Grande, F. Poy, D. Howie, J. Sumegi, C. Terhorst, and M.J. Eck. 2003. SAP couples Fyn to SLAM immune receptors. *Nat. Cell Biol.* 5:155–160. doi:10.1038/ncb920.

Chang, C., S.-Y. Wu, Y.-W. Kang, K.-P. Lin, T.-Y. Chen, L.J. Medeiros, and K.-C. Chang. 2015. High Levels of Regulatory T Cells in Blood Are a Poor Prognostic Factor in Patients With Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 144:935–944. doi:10.1309/AJCPUJGMVV6ZF4GG.

Chanut, A., F. Duguet, A. Marfak, A. David, B. Petit, M. Parrens, S. Durand-Panteix, M. Boulin-Deveza, N. Gachard, I. Youlyouz-Marfak, D. Bordessoule, J. Feuillard, and N. Faumont. 2014. RelA and RelB cross-talk and function in Epstein-Barr virus transformed B cells. *Leukemia.* 28:871–879. doi:10.1038/leu.2013.274.

Chatila, T.A., F. Blaeser, N. Ho, H.M. Lederman, C. Voulgaropoulos, C. Helms, and A.M. Bowcock. 2000. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J. Clin. Invest.* 106:R75-81. doi:10.1172/JCI11679.

Chaudhry, M.S., K.C. Gilmour, I.G. House, M. Layton, N. Panoskaltsis, M. Sohal, J.A. Trapani, and I. Voskoboinik. 2016. Missense mutations in the perforin (PRF1) gene as a cause of hereditary cancer predisposition. *Oncoimmunology.* 5:e1179415. doi:10.1080/2162402X.2016.1179415.

Chen, B.J., B. Chapuy, J. Ouyang, H.H. Sun, M.G.M. Roemer, M.L. Xu, H. Yu, C.D.M. Fletcher, G.J. Freeman, M.A. Shipp, and S.J. Rodig. 2013. PD-L1 expression is characteristic of a subset of aggressive B-cell lymphomas and virus-associated malignancies. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 19:3462–3473. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-0855.

Chen, H., P. Smith, R.F. Ambinder, and S.D. Hayward. 1999. Expression of Epstein-Barr virus BamHI-A rightward transcripts in latently infected B cells from peripheral blood. *Blood.* 93:3026–3032.

Chen, L., and D.B. Flies. 2013. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* 13:227–242. doi:10.1038/nri3405.

Chen, Y., V.K. Kuchroo, J. Inobe, D.A. Hafler, and H.L. Weiner. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265:1237–1240.

Chene, A., D. Donati, J. Orem, E.R. Mbidde, F. Kironde, M. Wahlgren, and M.T. Bejarano. 2009. Endemic Burkitt's lymphoma as a polymicrobial disease: new insights on the

interaction between *Plasmodium falciparum* and Epstein-Barr virus. *Semin. Cancer Biol.* 19:411–420. doi:10.1016/j.semcancer.2009.10.002.

Cherukuri, A., D.M. Rothstein, B. Clark, C.R. Carter, A. Davison, M. Hernandez-Fuentes, E. Hewitt, A.D. Salama, and R.J. Baker. 2014. Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 25:1575–1585. doi:10.1681/ASN.2013080837.

Chiang, A.K., Q. Tao, G. Srivastava, and F.C. Ho. 1996. Nasal NK- and T-cell lymphomas share the same type of Epstein-Barr virus latency as nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. *Int. J. Cancer.* 68:285–290. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19961104)68:3<285::AID-IJC3>3.0.CO;2-Y.

Chien, Y.C., J.Y. Chen, M.Y. Liu, H.I. Yang, M.M. Hsu, C.J. Chen, and C.S. Yang. 2001. Serologic markers of Epstein-Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N. Engl. J. Med.* 345:1877–1882. doi:10.1056/NEJMoa011610.

Cho, M.S., K.O. Fresen, and H. zur Hausen. 1980. Multiplicity-dependent biological and biochemical properties of Epstein-Barr virus (EBV) rescued from non-producer lines after superinfection with P3HR-1 EBV. *Int. J. Cancer.* 26:357–363.

Chong, L.C., D.D.W. Twa, A. Mottok, S. Ben-Neriah, B.W. Woolcock, Y. Zhao, K.J. Savage, M.A. Marra, D.W. Scott, R.D. Gascoyne, R.D. Morin, A.J. Mungall, and C. Steidl. 2016. Comprehensive characterization of programmed death ligand structural rearrangements in B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood.* 128:1206–1213. doi:10.1182/blood-2015-11-683003.

Churlaud, G., F. Pitoiset, F. Jebbawi, R. Lorenzon, B. Bellier, M. Rosenzweig, and D. Klatzmann. 2015. Human and Mouse CD8+CD25+FOXP3+ Regulatory T Cells at Steady State and during Interleukin-2 Therapy. *Front. Immunol.* 6. doi:10.3389/fimmu.2015.00171.

CIRI.

Clemens, M.J., K.G. Laing, I.W. Jeffrey, A. Schofield, T.V. Sharp, A. Elia, V. Matys, M.C. James, and V.J. Tilleray. 1994. Regulation of the interferon-inducible eIF-2 alpha protein kinase by small RNAs. *Biochimie.* 76:770–778.

Clementi, R., F. Locatelli, L. Dupré, A. Garaventa, L. Emmi, M. Bregni, G. Cefalo, A. Moretta, C. Danesino, M. Comis, A. Pession, U. Ramenghi, R. Maccario, M. Aricò, and M.G. Roncarolo. 2005. A proportion of patients with lymphoma may harbor mutations of the perforin gene. *Blood.* 105:4424–4428. doi:10.1182/blood-2004-04-1477.

Coffey, A.J., R.A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G.R. Howell, J.M. Bye, A.P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C.J. Shaw-

Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, A. Bolino, M. Seri, A. Lanyi, J.R. Davis, D. Webster, A. Harris, G. Lenoir, G. de St Basile, A. Jones, B.H. Behloradsky, H. Achatz, J. Murken, R. Fassler, J. Sumegi, G. Romeo, M. Vaudin, M.T. Ross, A. Meindl, and D.R. Bentley. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat. Genet.* 20:129–135. doi:10.1038/2424.

Cohen, J.I. 2015. Epstein–barr virus vaccines. *Clin. Transl. Immunol.* 4:e32. doi:10.1038/cti.2014.27.

Cohen, J.I., E.S. Jaffe, J.K. Dale, S. Pittaluga, H.E. Heslop, C.M. Rooney, S. Gottschalk, C.M. Bollard, V.K. Rao, A. Marques, P.D. Burbelo, S.-P. Turk, R. Fulton, A.S. Wayne, R.F. Little, M.S. Cairo, N.K. El-Mallawany, D. Fowler, C. Sportes, M.R. Bishop, W. Wilson, and S.E. Straus. 2011. Characterization and treatment of chronic active Epstein-Barr virus disease: a 28-year experience in the United States. *Blood.* 117:5835–5849. doi:10.1182/blood-2010-11-316745.

Cohen, J.I., H. Kimura, S. Nakamura, Y.-H. Ko, and E.S. Jaffe. 2009. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease in non-immunocompromised hosts: a status report and summary of an international meeting, 8-9 September 2008. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 20:1472–1482. doi:10.1093/annonc/mdp064.

Cohen, J.I., F. Wang, J. Mannick, and E. Kieff. 1989. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86:9558–9562.

Colliou, N., D. Picard, F. Caillot, S. Calbo, S. Le Corre, A. Lim, B. Lemercier, B. Le Mauff, M. Maho-Vaillant, S. Jacquot, C. Bedane, P. Bernard, F. Caux, C. Prost, E. Delaporte, M.-S. Doutre, B. Dreno, N. Franck, S. Ingen-Housz-Oro, O. Chosidow, C. Pauwels, C. Picard, J.-C. Roujeau, M. Sigal, E. Tancrede-Bohin, I. Templier, R. Eming, M. Hertl, M. D’Incan, P. Joly, and P. Musette. 2013. Long-term remissions of severe pemphigus after rituximab therapy are associated with prolonged failure of desmoglein B cell response. *Sci. Transl. Med.* 5:175ra30. doi:10.1126/scitranslmed.3005166.

Collison, L.W., V. Chaturvedi, A.L. Henderson, P.R. Giacomin, C. Guy, J. Bankoti, D. Finkelstein, K. Forbes, C.J. Workman, S.A. Brown, J.E. Rehg, M.L. Jones, H.-T. Ni, D. Artis, M.J. Turk, and D.A.A. Vignali. 2010. IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population. *Nat. Immunol.* 11:1093–1101. doi:10.1038/ni.1952.

Colomo, L., F. Loong, S. Rives, S. Pittaluga, A. Martínez, A. López-Guillermo, J. Ojanguren, V. Romagosa, E.S. Jaffe, and E. Campo. 2004. Diffuse large B-cell lymphomas with

plasmablastic differentiation represent a heterogeneous group of disease entities. *Am. J. Surg. Pathol.* 28:736–747.

Correale, J., and M. Farez. 2007. Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 61:97–108. doi:10.1002/ana.21067.

Correale, J., and M. Farez. 2009. Helminth antigens modulate immune responses in cells from multiple sclerosis patients through TLR2-dependent mechanisms. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 183:5999–6012. doi:10.4049/jimmunol.0900897.

Correale, J., M. Farez, and G. Razzitte. 2008. Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells. *Ann. Neurol.* 64:187–199. doi:10.1002/ana.21438.

Côte, M., M.M. Ménager, A. Burgess, N. Mahlaoui, C. Picard, C. Schaffner, F. Al-Manjomi, M. Al-Harbi, A. Alangari, F. Le Deist, A.R. Gennery, N. Prince, A. Cariou, P. Nitschke, U. Blank, G. El-Ghazali, G. Ménasché, S. Latour, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2009. Munc18-2 deficiency causes familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 and impairs cytotoxic granule exocytosis in patient NK cells. *J. Clin. Invest.* 119:3765–3773. doi:10.1172/JCI40732.

Countryman, J., H. Jenson, R. Seibl, H. Wolf, and G. Miller. 1987. Polymorphic proteins encoded within BZLF1 of defective and standard Epstein-Barr viruses disrupt latency. *J. Virol.* 61:3672–3679.

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

Creasy, C.L., and J. Chernoff. 1995. Cloning and characterization of a human protein kinase with homology to Ste20. *J. Biol. Chem.* 270:21695–21700.

Crequer, A., C. Picard, E. Patin, A. D'Amico, A. Abhyankar, M. Munzer, M. Debré, S.-Y. Zhang, G. de Saint-Basile, A. Fischer, L. Abel, G. Orth, J.-L. Casanova, and E. Jouanguy. 2012. Inherited MST1 Deficiency Underlies Susceptibility to EV-HPV Infections. *PLOS ONE.* 7:e44010. doi:10.1371/journal.pone.0044010.

Cui, D., L. Zhang, J. Chen, M. Zhu, L. Hou, B. Chen, and B. Shen. 2015. Changes in regulatory B cells and their relationship with rheumatoid arthritis disease activity. *Clin. Exp. Med.* 15:285–292. doi:10.1007/s10238-014-0310-9.

Daien, C.I., S. Gailhac, T. Mura, R. Audo, B. Combe, M. Hahne, and J. Morel. 2014. Regulatory B10 cells are decreased in patients with rheumatoid arthritis and are inversely correlated with disease activity. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ.* 66:2037–2046.

doi:10.1002/art.38666.

Daikoku, T., A. Kudoh, M. Fujita, Y. Sugaya, H. Isomura, N. Shirata, and T. Tsurumi. 2005. Architecture of replication compartments formed during Epstein-Barr virus lytic replication. *J. Virol.* 79:3409–3418. doi:10.1128/JVI.79.6.3409-3418.2005.

Damania, B. 2004. Oncogenic gamma-herpesviruses: comparison of viral proteins involved in tumorigenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:656–668. doi:10.1038/nrmicro958.

Dambaugh, T., C. Beisel, M. Hummel, W. King, S. Fennewald, A. Cheung, M. Heller, N. Raab-Traub, and E. Kieff. 1980. Epstein-Barr virus (B95-8) DNA VII: molecular cloning and detailed mapping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77:2999–3003.

Das, A., G. Ellis, C. Pallant, A.R. Lopes, P. Khanna, D. Peppas, A. Chen, P. Blair, G. Dusheiko, U. Gill, P.T. Kennedy, M. Brunetto, P. Lampertico, C. Mauri, and M.K. Maini. 2012. IL-10-producing regulatory B cells in the pathogenesis of chronic hepatitis B virus infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 189:3925–3935. doi:10.4049/jimmunol.1103139.

Daskalogianni, C., S. Pyndiah, S. Apcher, A. Mazars, B. Manoury, N. Ammari, K. Nylander, C. Voisset, M. Blondel, and R. Fåhræus. 2015. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 and ZEBRA: targets for therapeutic strategies against EBV-carrying cancers. *J. Pathol.* 235:334–341. doi:10.1002/path.4431.

David, A., N. Arnaud, M. Fradet, H. Lascaux, C. Ouk-Martin, N. Gachard, U. Zimmer-Strobl, J. Feuillard, and N. Faumont. 2017. C-Myc dysregulation is a co-transforming event for NF- κ B activated B-cells. *Haematologica.* doi:10.3324/haematol.2016.156281.

Dawson, C.W., R.J. Port, and L.S. Young. 2012. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin. Cancer Biol.* 22:144–153. doi:10.1016/j.semcancer.2012.01.004.

Dawson, C.W., G. Tramontanis, A.G. Eliopoulos, and L.S. Young. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J. Biol. Chem.* 278:3694–3704. doi:10.1074/jbc.M209840200.

de Boer, M., K. van Leeuwen, J. Geissler, F. van Alphen, E. de Vries, M. van der Kuip, S.W.J. Terheggen, H. Janssen, T.K. van den Berg, A.B. Meijer, D. Roos, and T.W. Kuijpers. 2017. Hermansky-Pudlak syndrome type 2: Aberrant pre-mRNA splicing and mislocalization of granule proteins in neutrophils. *Hum. Mutat.* 38:1402–1411. doi:10.1002/humu.23271.

de Masson, A., J.-D. Bouaziz, H. Le Buanec, M. Robin, A. O'Meara, N. Parquet, M. Rybojad, E. Hau, J.-B. Monfort, M. Branchtein, D. Michonneau, V. Dessirier, F. Sicre de Fontbrune, A.

- Bergeron, R., Itzykson, N., Dhédin, D., Bengoufa, R., Peffault de Latour, A., Xhaard, M., Bagot, A., Bensussan, and G. Socié. 2015. CD24(hi)CD27⁺ and plasmablast-like regulatory B cells in human chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 125:1830–1839. doi:10.1182/blood-2014-09-599159.
- de Oliveira, D.E., G. Ballon, and E. Cesarman. 2010. NF-kappaB signaling modulation by EBV and KSHV. *Trends Microbiol.* 18:248–257. doi:10.1016/j.tim.2010.04.001.
- de Saint Basile, G., G. Ménasché, and A. Fischer. 2010. Molecular mechanisms of biogenesis and exocytosis of cytotoxic granules. *Nat. Rev. Immunol.* 10:568–579. doi:10.1038/nri2803.
- de Turenne-Tessier, M., P. Jolicoeur, J.M. Middeldorp, and T. Ooka. 2005. Expression and analysis of the Epstein-Barr virus BARTF1-encoded protein from a tetracycline-regulatable adenovirus system. *Virus Res.* 109:9–18. doi:10.1016/j.virusres.2004.10.003.
- Deacon, E.M., G. Pallesen, G. Niedobitek, J. Crocker, L. Brooks, A.B. Rickinson, and L.S. Young. 1993. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* 177:339–349.
- Delbende, C., C. Verwaerde, A. Mougel, and D. Tranchand Bunel. 2009. Induction of therapeutic antibodies by vaccination against external loops of tumor-associated viral latent membrane protein. *J. Virol.* 83:11734–11745. doi:10.1128/JVI.00578-09.
- Dell'Angelica, E.C., H. Ohno, C.E. Ooi, E. Rabinovich, K.W. Roche, and J.S. Bonifacino. 1997. AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression. *EMBO J.* 16:917–928. doi:10.1093/emboj/16.5.917.
- Deng, J., and J. Galipeau. 2012. Reprogramming of B cells into regulatory cells with engineered fusokines. *Infect. Disord. Drug Targets.* 12:248–254.
- Derynck, R., J.A. Jarrett, E.Y. Chen, D.H. Eaton, J.R. Bell, R.K. Assoian, A.B. Roberts, M.B. Sporn, and D.V. Goeddel. 1985. Human transforming growth factor-beta complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. *Nature.* 316:701–705.
- De-Thé, G. 1972. Etiology of Burkitt's lymphoma. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer.* 39:225–226.
- Detre, C., M. Keszei, X. Romero, G.C. Tsokos, and C. Terhorst. 2010. SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions. *Semin. Immunopathol.* 32:157–171. doi:10.1007/s00281-009-0193-0.
- Deutsch, M., R. Mercado, and J.A. Parsons. 1978. Cancer of the nasopharynx in children. *Cancer.* 41:1128–1133.
- Devergne, O., E. Hatzivassiliou, K.M. Izumi, K.M. Kaye, M.F. Kleijnen, E. Kieff, and G.

- Mosialos. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell. Biol.* 16:7098–7108.
- Dhamne, C., Y. Chung, A.M. Alousi, L.J.N. Cooper, and D.Q. Tran. 2013. Peripheral and thymic foxp3(+) regulatory T cells in search of origin, distinction, and function. *Front. Immunol.* 4:253. doi:10.3389/fimmu.2013.00253.
- Dharnidharka, V.R. 2017. Peripheral Blood Epstein-Barr Viral Nucleic Acid Surveillance as a Marker for Posttransplant Cancer Risk. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 17:611–616. doi:10.1111/ajt.13982.
- Díaz-Alderete, A., J.C. Crispin, M.I. Vargas-Rojas, and J. Alcocer-Varela. 2004. IL-10 production in B cells is confined to CD154+ cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Autoimmun.* 23:379–383. doi:10.1016/j.jaut.2004.10.001.
- Dillner, J., B. Kallin, H. Alexander, I. Ernberg, M. Uno, Y. Ono, G. Klein, and R.A. Lerner. 1986. An Epstein-Barr virus (EBV)-determined nuclear antigen (EBNA5) partly encoded by the transformation-associated Bam WYH region of EBV DNA: preferential expression in lymphoblastoid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83:6641–6645.
- Dolcetti, R., M. Boiocchi, A. Ghoghini, and A. Carbone. 2001. Pathogenetic and histogenetic features of HIV-associated Hodgkin's disease. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990. 37:1276–1287.
- Dong, H., S.E. Strome, D.R. Salomao, H. Tamura, F. Hirano, D.B. Flies, P.C. Roche, J. Lu, G. Zhu, K. Tamada, V.A. Lennon, E. Celis, and L. Chen. 2002. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. *Nat. Med.* 8:793–800. doi:10.1038/nm730.
- Draoua, H.Y., L. Tsao, D.M. Mancini, L.J. Addonizio, G. Bhagat, and B. Alobeid. 2004. T-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders after cardiac transplantation: a single institutional experience. *Br. J. Haematol.* 127:429–432. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05212.x.
- Duddy, M., M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H.J. Kim, and A. Bar-Or. 2007. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 178:6092–6099.
- Duddy, M.E., A. Alter, and A. Bar-Or. 2004. Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172:3422–3427.
- Dueñas, S., S.A. Aguila, and G. Pimienta. 2017. A workflow for in silico design of hIL-10

and ebvIL-10 inhibitors using well-known miniprotein scaffolds. *J. Mol. Model.* 23:118. doi:10.1007/s00894-017-3276-1.

Durand-Panteix, S., M. Farhat, I. Youlyouz-Marfak, P. Rouaud, C. Ouk-Martin, A. David, N. Faumont, J. Feuillard, and C. Jayat-Vignoles. 2012. B7-H1, which represses EBV-immortalized B cell killing by autologous T and NK cells, is oppositely regulated by c-Myc and EBV latency III program at both mRNA and secretory lysosome levels. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 189:181–190. doi:10.4049/jimmunol.1102277.

Edgar, J.R. 2016. Q&A: What are exosomes, exactly? *BMC Biol.* 14:46. doi:10.1186/s12915-016-0268-z.

Egwuagu, C.E., and C.-R. Yu. 2015. Interleukin 35-Producing B Cells (i35-Breg): A New Mediator of Regulatory B-Cell Functions in CNS Autoimmune Diseases. *Crit. Rev. Immunol.* 35:49–57.

Eisenbarth, G.S. 1986. Type I diabetes mellitus. A chronic autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 314:1360–1368. doi:10.1056/NEJM198605223142106.

Eiza, N., E. Toubi, and Z. Vadasz. 2016. Increased T and B Regulatory Cell Function Contributes to the Persistence of HCV and Other Viral Infections. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ.* 18:159–161.

El Abed, R., V. Bourdon, I. Voskoboinik, H. Omri, Y.B. Youssef, M.A. Laatiri, L. Huiart, F. Eisinger, L. Rabayrol, M. Frenay, P. Gesta, L. Demange, H. Dreyfus, V. Bonadona, C. Dugast, H. Zattara, L. Faivre, M. Zaier, S.Y. Jemni, T. Noguchi, H. Sobol, and Z. Soua. 2011. Molecular study of the perforin gene in familial hematological malignancies. *Hered. Cancer Clin. Pract.* 9:9. doi:10.1186/1897-4287-9-9.

El-Fattah, M.A. 2016. Clinical characteristics and survival outcome of primary effusion lymphoma: A review of 105 patients. *Hematol. Oncol.* doi:10.1002/hon.2372.

Eliopoulos, A.G., S.M. Blake, J.E. Floettmann, M. Rowe, and L.S. Young. 1999a. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates the JNK pathway through its extreme C terminus via a mechanism involving TRADD and TRAF2. *J. Virol.* 73:1023–1035.

Eliopoulos, A.G., N.J. Gallagher, S.M. Blake, C.W. Dawson, and L.S. Young. 1999b. Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* 274:16085–16096.

Eliopoulos, A.G., E.R. Waites, S.M.S. Blake, C. Davies, P. Murray, and L.S. Young. 2003. TRAF1 is a critical regulator of JNK signaling by the TRAF-binding domain of the Epstein-

Barr virus-encoded latent infection membrane protein 1 but not CD40. *J. Virol.* 77:1316–1328.

Epstein, M.A., G. Henle, B.G. Achong, and Y.M. Barr. 1964. MORPHOLOGICAL AND BIOLOGICAL STUDIES ON A VIRUS IN CULTURED LYMPHOBLASTS FROM BURKITT'S LYMPHOMA. *J. Exp. Med.* 121:761–770.

Evans, A.S., and J.C. Niederman. 1989. Epstein-Barr Virus. *In* *Viral Infections of Humans*. Springer, Boston, MA. 265–292.

Fachiroh, J., S.J.C. Stevens, S.M. Haryana, and J.M. Middeldorp. 2010. Combination of Epstein-Barr virus scaffold (BdRF1/VCA-p40) and small capsid protein (BFRF3/VCA-p18) into a single molecule for improved serodiagnosis of acute and malignant EBV-driven disease. *J. Virol. Methods.* 169:79–86. doi:10.1016/j.jviromet.2010.07.001.

Fager Ferrari, M., E. Leinoe, M. Rossing, E. Norström, K. Strandberg, T. Steen Sejersen, K. Qvortrup, and E. Zetterberg. 2017. Germline heterozygous variants in genes associated with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis as a cause of increased bleeding. *Platelets.* 1–9. doi:10.1080/09537104.2017.1293808.

Fallarino, F., U. Grohmann, C. Vacca, R. Bianchi, C. Orabona, A. Spreca, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 9:1069–1077. doi:10.1038/sj.cdd.4401073.

Fallarino, F., U. Grohmann, S. You, B.C. McGrath, D.R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M.L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M.C. Fioretti, and P. Puccetti. 2006. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 176:6752–6761.

Fallon, P.G., and N.E. Mangan. 2007. Suppression of TH2-type allergic reactions by helminth infection. *Nat. Rev. Immunol.* 7:220–230. doi:10.1038/nri2039.

Fan, W., D. Bubman, A. Chadburn, W.J. Harrington, E. Cesarman, and D.M. Knowles. 2005. Distinct Subsets of Primary Effusion Lymphoma Can Be Identified Based on Their Cellular Gene Expression Profile and Viral Association. *J. Virol.* 79:1244–1251. doi:10.1128/JVI.79.2.1244-1251.2005.

Fang, W., S. Hong, N. Chen, X. He, J. Zhan, T. Qin, T. Zhou, Z. Hu, Y. Ma, Y. Zhao, Y. Tian, Y. Yang, C. Xue, Y. Tang, Y. Huang, H. Zhao, and L. Zhang. 2015. PD-L1 is remarkably over-expressed in EBV-associated pulmonary lymphoepithelioma-like carcinoma and related to poor disease-free survival. *Oncotarget.* 6:33019–33032.

doi:10.18632/oncotarget.5028.

Fang, W., J. Zhang, S. Hong, J. Zhan, N. Chen, T. Qin, Y. Tang, Y. Zhang, S. Kang, T. Zhou, X. Wu, W. Liang, Z. Hu, Y. Ma, Y. Zhao, Y. Tian, Y. Yang, C. Xue, Y. Yan, X. Hou, P. Huang, Y. Huang, H. Zhao, and L. Zhang. 2014. EBV-driven LMP1 and IFN- γ up-regulate PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma: Implications for oncotargeted therapy. *Oncotarget*. 5:12189–12202. doi:10.18632/oncotarget.2608.

Fassone, L., G. Gaidano, C. Ariatti, D. Vivenza, D. Capello, A. Gloghini, A.M. Cilia, D. Buonaiuto, D. Rossi, C. Pastore, A. Carbone, and G. Saglio. 2000. The role of cytokines in the pathogenesis and management of AIDS-related lymphomas. *Leuk. Lymphoma*. 38:481–488. doi:10.3109/10428190009059266.

Faumont, N., S. Durand-Panteix, M. Schlee, S. Grömminger, M. Schuhmacher, M. Hölzel, G. Laux, R. Mailhammer, A. Rosenwald, L.M. Staudt, G.W. Bornkamm, and J. Feuillard. 2009. c-Myc and Rel/NF-kappaB are the two master transcriptional systems activated in the latency III program of Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol*. 83:5014–5027. doi:10.1128/JVI.02264-08.

Feldmann, J., I. Callebaut, G. Raposo, S. Certain, D. Bacq, C. Dumont, N. Lambert, M. Ouachée-Chardin, G. Chedeville, H. Tamary, V. Minard-Colin, E. Vilmer, S. Blanche, F. Le Deist, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2003. Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3). *Cell*. 115:461–473.

Felices, M., and L.J. Berg. 2008. The Tec kinases Itk and Rlk regulate NKT cell maturation, cytokine production, and survival. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 180:3007–3018.

Feng, P., E.C. Ren, D. Liu, S.H. Chan, and H. Hu. 2000. Expression of Epstein-Barr virus lytic gene BRLF1 in nasopharyngeal carcinoma: potential use in diagnosis. *J. Gen. Virol*. 81:2417–2423. doi:10.1099/0022-1317-81-10-2417.

Fields, B.N., D.M. Knipe, and P.M. Howley. 2007. *Fields virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Figueiró, F., L. Muller, S. Funk, E.K. Jackson, A.M.O. Battastini, and T.L. Whiteside. 2016. Phenotypic and functional characteristics of CD39(high) human regulatory B cells (Breg). *Oncoimmunology*. 5:e1082703. doi:10.1080/2162402X.2015.1082703.

Fillatreau, S. 2016. Regulatory roles of B cells in infectious diseases. *Clin. Exp. Rheumatol*. 34:1–5.

Fillatreau, S., C.H. Sweeney, M.J. McGeachy, D. Gray, and S.M. Anderton. 2002. B cells

regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3:944–950. doi:10.1038/ni833.

Finberg, R.W., D.M. Knipe, and E.A. Kurt-Jones. 2005. Herpes simplex virus and toll-like receptors. *Viral Immunol.* 18:457–465. doi:10.1089/vim.2005.18.457.

Fingeroth, J.D., M.L. Clabby, and J.D. Strominger. 1988. Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J. Virol.* 62:1442–1447.

Finney, C.A.M., M.D. Taylor, M.S. Wilson, and R.M. Maizels. 2007. Expansion and activation of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Heligmosomoides polygyrus* infection. *Eur. J. Immunol.* 37:1874–1886. doi:10.1002/eji.200636751.

Fiola, S., D. Gosselin, K. Takada, and J. Gosselin. 2010. TLR9 contributes to the recognition of EBV by primary monocytes and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 185:3620–3631. doi:10.4049/jimmunol.0903736.

Fischer, A., S. Hacein-Bey Abina, F. Touzot, and M. Cavazzana. 2015. Gene therapy for primary immunodeficiencies. *Clin. Genet.* 88:507–515. doi:10.1111/cge.12576.

Fischer, E., C. Delibrias, and M.D. Kazatchkine. 1991. Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 146:865–869.

Flores-Borja, F., A. Bosma, D. Ng, V. Reddy, M.R. Ehrenstein, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2013. CD19+CD24hiCD38hi B cells maintain regulatory T cells while limiting TH1 and TH17 differentiation. *Sci. Transl. Med.* 5:173ra23. doi:10.1126/scitranslmed.3005407.

Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, M.A. Gavin, and A.Y. Rudensky. 2005a. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 6:1142–1151. doi:10.1038/ni1263.

Fontenot, J.D., J.P. Rasmussen, L.M. Williams, J.L. Dooley, A.G. Farr, and A.Y. Rudensky. 2005b. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 22:329–341. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.016.

Francisco, L.M., V.H. Salinas, K.E. Brown, V.K. Vanguri, G.J. Freeman, V.K. Kuchroo, and A.H. Sharpe. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206:3015–3029. doi:10.1084/jem.20090847.

Franquesa, M., F.K. Mensah, R. Huizinga, T. Strini, L. Boon, E. Lombardo, O. DelaRosa, J.D. Laman, J.M. Grinyó, W. Weimar, M.G.H. Betjes, C.C. Baan, and M.J. Hoogduijn. 2015. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasmablast formation and induce regulatory B cells independently of T helper cells. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 33:880–891. doi:10.1002/stem.1881.

Frappier, L. 2012. The Epstein-Barr Virus EBNA1 Protein. *Scientifica*. 2012:438204. doi:10.6064/2012/438204.

Friedman, R.C., K.K.-H. Farh, C.B. Burge, and D.P. Bartel. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19:92–105. doi:10.1101/gr.082701.108.

Fruehling, S., S.K. Lee, R. Herrold, B. Frech, G. Laux, E. Kremmer, F.A. Grässer, and R. Longnecker. 1996. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J. Virol.* 70:6216–6226.

Fruehling, S., and R. Longnecker. 1997. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology*. 235:241–251. doi:10.1006/viro.1997.8690.

Frumento, G., R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, and G.B. Ferrara. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* 196:459–468.

Fukayama, M., T. Ibuka, Y. Hayashi, T. Ooba, M. Koike, and S. Mizutani. 1993. Epstein-Barr virus in pyothorax-associated pleural lymphoma. *Am. J. Pathol.* 143:1044–1049.

Fukuda, M., and Y. Kawaguchi. 2014. Role of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif of latent membrane protein 2A (LMP2A) in Epstein-Barr virus LMP2A-induced cell transformation. *J. Virol.* 88:5189–5194. doi:10.1128/JVI.03714-13.

Fukuda, M., and R. Longnecker. 2004. Latent Membrane Protein 2A Inhibits Transforming Growth Factor- β 1-Induced Apoptosis through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *J. Virol.* 78:1697–1705. doi:10.1128/JVI.78.4.1697-1705.2004.

Furtado, G.C., M.A. Curotto de Lafaille, N. Kutchukhidze, and J.J. Lafaille. 2002. Interleukin 2 signaling is required for CD4(+) regulatory T cell function. *J. Exp. Med.* 196:851–857.

Gaidano, G., D. Capello, L. Fassone, A. Gloghini, A.M. Cilia, C. Ariatti, D. Buonaiuto, D. Vivenza, M. Gallicchio, G.C. Avanzi, M. Prat, and A. Carbone. 2000. Molecular characterization of HHV-8 positive primary effusion lymphoma reveals pathogenetic and histogenetic features of the disease. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 16:215–224.

Galanina, N., J. Kline, and M.R. Bishop. 2017. Emerging role of checkpoint blockade therapy in lymphoma. *Ther. Adv. Hematol.* 8:81–90. doi:10.1177/2040620716673787.

Galbán, S., and C.S. Duckett. 2010. XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ.* 17:54–60. doi:10.1038/cdd.2009.81.

Gallo, A., S. Vella, M. Miele, F. Timoneri, M. Di Bella, S. Bosi, M. Sciveres, and P.G. Conaldi. 2017. Global profiling of viral and cellular non-coding RNAs in Epstein-Barr virus-induced lymphoblastoid cell lines and released exosome cargos. *Cancer Lett.* 388:334–343. doi:10.1016/j.canlet.2016.12.003.

Ganti, S.N., T.C. Albershardt, B.M. Iritani, and A. Ruddell. 2015. Regulatory B cells preferentially accumulate in tumor-draining lymph nodes and promote tumor growth. *Sci. Rep.* 5:12255. doi:10.1038/srep12255.

Gao, N., J. Dresel, V. Eckstein, R. Gellert, H. Störch, R.K.C. Venigalla, V. Schwenger, R. Max, N. Blank, H.-M. Lorenz, and T. Tretter. 2014. Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol. Hoboken NJ.* 66:2849–2861. doi:10.1002/art.38742.

Garibal, J., E. Hollville, A.I. Bell, G.L. Kelly, B. Renouf, Y. Kawaguchi, A.B. Rickinson, and J. Wiels. 2007. Truncated form of the Epstein-Barr virus protein EBNA-LP protects against caspase-dependent apoptosis by inhibiting protein phosphatase 2A. *J. Virol.* 81:7598–7607. doi:10.1128/JVI.02435-06.

Garzelli, C., F.E. Taub, J.E. Scharff, B.S. Prabhakar, F. Ginsberg-Fellner, and A.L. Notkins. 1984. Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes produce monoclonal autoantibodies that react with antigens in multiple organs. *J. Virol.* 52:722–725.

Gatalica, Z., N. Bilalovic, S. Vranic, D. Arguello, S. Reddy, and N. Ghosh. 2015. PD-L1 and PD1 Expression in Lymphomas. *Blood.* 126:3899–3899.

Gaudreault, E., S. Fiola, M. Olivier, and J. Gosselin. 2007. Epstein-Barr virus induces MCP-1 secretion by human monocytes via TLR2. *J. Virol.* 81:8016–8024. doi:10.1128/JVI.00403-07.

Georgiou, K., L. Chen, M. Berglund, W. Ren, N.F.C.C. de Miranda, S. Lisboa, M. Fangazio, S. Zhu, Y. Hou, K. Wu, W. Fang, X. Wang, B. Meng, L. Zhang, Y. Zeng, G. Bhagat, M. Nordenskjöld, C. Sundström, G. Enblad, R. Dalla-Favera, H. Zhang, M.R. Teixeira, L. Pasqualucci, R. Peng, and Q. Pan-Hammarström. 2016. Genetic basis of PD-L1 overexpression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 127:3026–3034. doi:10.1182/blood-2015-12-686550.

Gershon, R.K., and K. Kondo. 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology.* 18:723–737.

Giacomini, E., F. Rizzo, M.P. Etna, M. Cruciani, R. Mechelli, M.C. Buscarinu, F. Pica, C. D’Agostini, M. Salvetti, E.M. Coccia, and M. Severa. 2017. Thymosin- α 1 expands deficient IL-10-producing regulatory B cell subsets in relapsing-remitting multiple sclerosis patients.

Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. 1352458517695892.
doi:10.1177/1352458517695892.

Gires, O., U. Zimmer-Strobl, R. Gonnella, M. Ueffing, G. Marschall, R. Zeidler, D. Pich, and W. Hammerschmidt. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J.* 16:6131–6140. doi:10.1093/emboj/16.20.6131.

Glaser, R., M.L. Litsky, D.A. Padgett, R.A. Baiocchi, E.V. Yang, M. Chen, P.-E. Yeh, K.B. Green-Church, M.A. Caligiuri, and M.V. Williams. 2006. EBV-encoded dUTPase induces immune dysregulation: Implications for the pathophysiology of EBV-associated disease. *Virology.* 346:205–218. doi:10.1016/j.virol.2005.10.034.

Goldenberg, M.M. 2012. Multiple Sclerosis Review. *Pharm. Ther.* 37:175–184.

Gomez-Rodriguez, J., N. Sahu, R. Handon, T.S. Davidson, S.M. Anderson, M.R. Kirby, A. August, and P.L. Schwartzberg. 2009. Differential expression of interleukin-17A and -17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity.* 31:587–597. doi:10.1016/j.immuni.2009.07.009.

Gong, Y., C. Zhao, P. Zhao, M. Wang, G. Zhou, F. Han, Y. Cui, J. Qian, H. Zhang, H. Xiong, J. Sheng, and T. Jiang. 2015. Role of IL-10-Producing Regulatory B Cells in Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Dig. Dis. Sci.* 60:1308–1314. doi:10.1007/s10620-014-3358-1.

Gordadze, A.V., C.W. Onunwor, R. Peng, D. Poston, E. Kremmer, and P.D. Ling. 2004. EBNA2 amino acids 3 to 30 are required for induction of LMP-1 and immortalization maintenance. *J. Virol.* 78:3919–3929.

Gosselin, J., J. Menezes, M. D'Addario, J. Hiscott, L. Flamand, G. Lamoureux, and D. Oth. 1991. Inhibition of tumor necrosis factor-alpha transcription by Epstein-Barr virus. *Eur. J. Immunol.* 21:203–208. doi:10.1002/eji.1830210130.

Gosselin, J., A. TomoIu, R.C. Gallo, and L. Flamand. 1999. Interleukin-15 as an activator of natural killer cell-mediated antiviral response. *Blood.* 94:4210–4219.

Gottschalk, S., O.L. Edwards, U. Sili, M.H. Huls, T. Goltsova, A.R. Davis, H.E. Heslop, and C.M. Rooney. 2003. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood.* 101:1905–1912. doi:10.1182/blood-2002-05-1514.

Gradoville, L., D. Kwa, A. El-Guindy, and G. Miller. 2002. Protein kinase C-independent activation of the Epstein-Barr virus lytic cycle. *J. Virol.* 76:5612–5626.

Grainger, J.R., K.A. Smith, J.P. Hewitson, H.J. McSorley, Y. Harcus, K.J. Filbey, C.A.M.

Finney, E.J.D. Greenwood, D.P. Knox, M.S. Wilson, Y. Belkaid, A.Y. Rudensky, and R.M. Maizels. 2010. Helminth secretions induce de novo T cell Foxp3 expression and regulatory function through the TGF- β pathway. *J. Exp. Med.* 207:2331–2341. doi:10.1084/jem.20101074.

Grasis, J.A., D.M. Guimond, N.R. Cam, K. Herman, P. Magotti, J.D. Lambris, and C.D. Tsoukas. 2010. In vivo significance of ITK-SLP-76 interaction in cytokine production. *Mol. Cell. Biol.* 30:3596–3609. doi:10.1128/MCB.01657-09.

Gray, M., K. Miles, D. Salter, D. Gray, and J. Savill. 2007. Apoptotic cells protect mice from autoimmune inflammation by the induction of regulatory B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104:14080–14085. doi:10.1073/pnas.0700326104.

Green, D.R., P.M. Flood, and R.K. Gershon. 1983. Immunoregulatory T-cell pathways. *Annu. Rev. Immunol.* 1:439–463. doi:10.1146/annurev.iy.01.040183.002255.

Green, M.R., S. Rodig, P. Juszczynski, J. Ouyang, P. Sinha, E. O'Donnell, D. Neuberg, and M.A. Shipp. 2012. Constitutive AP-1 activity and EBV infection induce PD-L1 in Hodgkin lymphomas and posttransplant lymphoproliferative disorders: implications for targeted therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 18:1611–1618. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-1942.

Greenfeld, H., K. Takasaki, M.J. Walsh, I. Ersing, K. Bernhardt, Y. Ma, B. Fu, C.W. Ashbaugh, J. Cabo, S.B. Mollo, H. Zhou, S. Li, and B.E. Gewurz. 2015. TRAF1 Coordinates Polyubiquitin Signaling to Enhance Epstein-Barr Virus LMP1-Mediated Growth and Survival Pathway Activation. *PLoS Pathog.* 11:e1004890. doi:10.1371/journal.ppat.1004890.

Griscelli, C., A. Durandy, D. Guy-Grand, F. Daguillard, C. Herzog, and M. Prunieras. 1978. A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am. J. Med.* 65:691–702.

Grivennikov, S., and M. Karin. 2010. Dangerous liaisons: STAT3 and NF- κ B collaboration and crosstalk in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev.* 21:11–19. doi:10.1016/j.cytogfr.2009.11.005.

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

Grossman, S.R., E. Johannsen, X. Tong, R. Yalamanchili, and E. Kieff. 1994. The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:7568–7572.

Groux, H., F. Cottrez, C. Montpellier, B. Quatannens, J. Coll, D. Stehelin, and C. Auriault. 1997a. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood*. 89:4521–4530.

Groux, H., A. O’Garra, M. Bigler, M. Rouleau, S. Antonenko, J.E. de Vries, and M.G. Roncarolo. 1997b. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 389:737–742. doi:10.1038/39614.

Gruhne, B., R. Sompallae, D. Marescotti, S.A. Kamranvar, S. Gastaldello, and M.G. Masucci. 2009. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:2313–2318. doi:10.1073/pnas.0810619106.

Grywalska, E., and J. Rolinski. 2015. Epstein-Barr Virus–Associated Lymphomas. *Semin. Oncol.* 42:291–303. doi:10.1053/j.seminoncol.2014.12.030.

Gu, A.-D., Y.-B. Xie, H.-Y. Mo, W.-H. Jia, M.-Y. Li, M. Li, L.-Z. Chen, Q.-S. Feng, Q. Liu, C.-N. Qian, and Y.-X. Zeng. 2008. Antibodies against Epstein-Barr virus gp78 antigen: a novel marker for serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma detected by xMAP technology. *J. Gen. Virol.* 89:1152–1158. doi:10.1099/vir.0.83686-0.

Guan, H., Y. Lan, Y. Wan, Q. Wang, C. Wang, L. Xu, Y. Chen, W. Liu, X. Zhang, Y. Li, Y. Gu, Z. Wang, and F. Xie. 2016a. PD-L1 mediated the differentiation of tumor-infiltrating CD19(+) B lymphocytes and T cells in Invasive breast cancer. *Oncoimmunology*. 5:e1075112. doi:10.1080/2162402X.2015.1075112.

Guan, H., Y. Wan, J. Lan, Q. Wang, Z. Wang, Y. Li, J. Zheng, X. Zhang, Z. Wang, Y. Shen, and F. Xie. 2016b. PD-L1 is a critical mediator of regulatory B cells and T cells in invasive breast cancer. *Sci. Rep.* 6:35651. doi:10.1038/srep35651.

Halacli, S.O., D.C. Ayvaz, C. Sun-Tan, B. Erman, E. Uz, D.Y. Yilmaz, K. Ozgul, İ. Tezcan, and O. Sanal. 2015. STK4 (MST1) deficiency in two siblings with autoimmune cytopenias: A novel mutation. *Clin. Immunol. Orlando Fla.* 161:316–323. doi:10.1016/j.clim.2015.06.010.

Han, I., S. Harada, D. Weaver, Y. Xue, W. Lane, S. Orstavik, B. Skalhegg, and E. Kieff. 2001. EBNA-LP associates with cellular proteins including DNA-PK and HA95. *J. Virol.* 75:2475–2481. doi:10.1128/JVI.75.5.2475-2481.2001.

Harada, S., and E. Kieff. 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J. Virol.* 71:6611–6618.

Hardwick, J.M., P.M. Lieberman, and S.D. Hayward. 1988. A new Epstein-Barr virus transactivator, R, induces expression of a cytoplasmic early antigen. *J. Virol.* 62:2274–2284.

- Harris-Arnold, A., C.P. Arnold, S. Schaffert, O. Hatton, S.M. Krams, C.O. Esquivel, and O.M. Martinez. 2015. Epstein-Barr virus modulates host cell microRNA-194 to promote IL-10 production and B lymphoma cell survival. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 15:2814–2824. doi:10.1111/ajt.13375.
- Harter, M.R., C.-D. Liu, C.-L. Shen, E. Gonzalez-Hurtado, Z.-M. Zhang, M. Xu, E. Martinez, C.-W. Peng, and J. Song. 2016. BS69/ZMYND11 C-Terminal Domains Bind and Inhibit EBNA2. *PLoS Pathog.* 12:e1005414. doi:10.1371/journal.ppat.1005414.
- Hatton, O., S.L. Lambert, S.M. Krams, and O.M. Martinez. 2012. Src kinase and Syk activation initiate PI3K signaling by a chimeric latent membrane protein 1 in Epstein-Barr virus (EBV)+ B cell lymphomas. *PloS One.* 7:e42610. doi:10.1371/journal.pone.0042610.
- Haverkos, B.M., Y. Huang, A. Gru, P. Pancholi, A.G. Freud, A. Mishra, A.S. Ruppert, R.A. Baiocchi, and P. Porcu. 2017. Frequency and clinical correlates of elevated plasma Epstein-Barr virus DNA at diagnosis in peripheral T-cell lymphomas. *Int. J. Cancer.* 140:1899–1906. doi:10.1002/ijc.30566.
- He, Y., H. Qian, Y. Liu, L. Duan, Y. Li, and G. Shi. 2014a. The Roles of Regulatory B Cells in Cancer. *J. Immunol. Res.* 2014. doi:10.1155/2014/215471.
- He, Y., H. Qian, Y. Liu, L. Duan, Y. Li, and G. Shi. 2014b. The roles of regulatory B cells in cancer. *J. Immunol. Res.* 2014:215471. doi:10.1155/2014/215471.
- Heller, K.N., J. Upshaw, B. Seyoum, H. Zebroski, and C. Münz. 2007. Distinct memory CD4+ T-cell subsets mediate immune recognition of Epstein Barr virus nuclear antigen 1 in healthy virus carriers. *Blood.* 109:1138–1146. doi:10.1182/blood-2006-05-023663.
- Henle, G., and W. Henle. 1966. Immunofluorescence in Cells Derived from Burkitt's Lymphoma. *J. Bacteriol.* 91:1248–1256.
- Henle, G., and W. Henle. 1976. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* 17:1–7.
- Henle, G., and W. Henle. 1979. The Virus as the Etiologic Agent of Infectious Mononucleosis. In *The Epstein-Barr Virus*. Springer, Berlin, Heidelberg. 297–320.
- Henle, W., G. Henle, J. Andersson, I. Ernberg, G. Klein, C.A. Horwitz, G. Marklund, L. Rymo, C. Wellinder, and S.E. Straus. 1987. Antibody responses to Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen (EBNA)-1 and EBNA-2 in acute and chronic Epstein-Barr virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84:570–574.
- Herbst, H., H.D. Foss, J. Samol, I. Araujo, H. Klotzbach, H. Krause, A. Agathangelou, G. Niedobitek, and H. Stein. 1996. Frequent expression of interleukin-10 by Epstein-Barr virus-

harboring tumor cells of Hodgkin's disease. *Blood*. 87:2918–2929.

Herrero, J.A., P. Mathew, and C.V. Paya. 1995. LMP-1 activates NF-kappa B by targeting the inhibitory molecule I kappa B alpha. *J. Virol.* 69:2168–2174.

Hinds, M.G., R.S. Norton, D.L. Vaux, and C.L. Day. 1999. Solution structure of a baculoviral inhibitor of apoptosis (IAP) repeat. *Nat. Struct. Biol.* 6:648–651. doi:10.1038/10701.

Hintzen, R.Q., R. de Jong, S.M. Lens, M. Brouwer, P. Baars, and R.A. van Lier. 1993. Regulation of CD27 expression on subsets of mature T-lymphocytes. *J. Immunol.* 151:2426–2435.

Hislop, A.D., N.E. Annels, N.H. Gudgeon, A.M. Leese, and A.B. Rickinson. 2002. Epitope-specific evolution of human CD8(+) T cell responses from primary to persistent phases of Epstein-Barr virus infection. *J. Exp. Med.* 195:893–905.

Hislop, A.D., U. Palendira, A.M. Leese, P.D. Arkwright, P.S. Rohrllich, S.G. Tangye, H.B. Gaspar, A.C. Lankester, A. Moretta, and A.B. Rickinson. 2010. Impaired Epstein-Barr virus-specific CD8+ T-cell function in X-linked lymphoproliferative disease is restricted to SLAM family-positive B-cell targets. *Blood*. 116:3249–3257. doi:10.1182/blood-2009-09-238832.

Hislop, A.D., M.E. Rensing, D. van Leeuwen, V.A. Pudney, D. Horst, D. Koppers-Lalic, N.P. Croft, J.J. Neefjes, A.B. Rickinson, and E.J.H.J. Wiertz. 2007a. A CD8+ T cell immune evasion protein specific to Epstein-Barr virus and its close relatives in Old World primates. *J. Exp. Med.* 204:1863–1873. doi:10.1084/jem.20070256.

Hislop, A.D., G.S. Taylor, D. Sauce, and A.B. Rickinson. 2007b. Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu. Rev. Immunol.* 25:587–617. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141553.

Hitt, M.M., M.J. Allday, T. Hara, L. Karran, M.D. Jones, P. Busson, T. Tursz, I. Ernberg, and B.E. Griffin. 1989. EBV gene expression in an NPC-related tumour. *EMBO J.* 8:2639–2651.

Hjalgrim, H., K.E. Smedby, K. Rostgaard, D. Molin, S. Hamilton-Dutoit, E.T. Chang, E. Ralfkiaer, C. Sundström, H.-O. Adami, B. Glimelius, and M. Melbye. 2007. Infectious mononucleosis, childhood social environment, and risk of Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 67:2382–2388. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-3566.

Hohaus, S., R. Santangelo, M. Giachelia, B. Vannata, G. Massini, A. Cuccaro, M. Martini, V. Cesarini, T. Cenci, F. D'Alo, M.T. Voso, G. Fadda, G. Leone, and L.M. Larocca. 2011. The viral load of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in peripheral blood predicts for biological and clinical characteristics in Hodgkin lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17:2885–2892. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3327.

- Hsieh, C.-S., Y. Zheng, Y. Liang, J.D. Fontenot, and A.Y. Rudensky. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* 7:401–410. doi:10.1038/ni1318.
- Hsieh, J.J., T. Henkel, P. Salmon, E. Robey, M.G. Peterson, and S.D. Hayward. 1996. Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2. *Mol. Cell. Biol.* 16:952–959.
- Hsu, D.H., R. de Waal Malefyt, D.F. Fiorentino, M.N. Dang, P. Vieira, J. de Vries, H. Spits, T.R. Mosmann, and K.W. Moore. 1990. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science.* 250:830–832.
- Hu, F., H. Liu, X. Liu, X. Zhang, L. Xu, H. Zhu, Y. Li, L. Shi, L. Ren, J. Zhang, Z. Li, and Y. Jia. 2017. Pathogenic conversion of regulatory B10 cells into osteoclast-priming cells in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* 76:53–62. doi:10.1016/j.jaut.2016.09.002.
- Huck, K., O. Feyen, T. Niehues, F. Rüschemdorf, N. Hübner, H.-J. Laws, T. Teliëps, S. Knapp, H.-H. Wacker, A. Meindl, H. Jumaa, and A. Borkhardt. 2009. Girls homozygous for an IL-2-inducible T cell kinase mutation that leads to protein deficiency develop fatal EBV-associated lymphoproliferation. *J. Clin. Invest.* 119:1350–1358.
- Humme, S., G. Reisbach, R. Feederle, H.-J. Delecluse, K. Bousset, W. Hammerschmidt, and A. Schepers. 2003. The EBV nuclear antigen 1 (EBNA1) enhances B cell immortalization several thousandfold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:10989–10994. doi:10.1073/pnas.1832776100.
- Hurwitz, S.N., D. Nkosi, M.M. Conlon, S.B. York, X. Liu, D.C. Tremblay, and D.G. Meckes. 2017. CD63 Regulates Epstein-Barr Virus LMP1 Exosomal Packaging, Enhancement of Vesicle Production, and Noncanonical NF- κ B Signaling. *J. Virol.* 91. doi:10.1128/JVI.02251-16.
- Hutt-Fletcher, L.M. 2007. Epstein-Barr virus entry. *J. Virol.* 81:7825–7832. doi:10.1128/JVI.00445-07.
- Hwu, P., M.X. Du, R. Lapointe, M. Do, M.W. Taylor, and H.A. Young. 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 164:3596–3599.
- Iempridee, T., S. Das, I. Xu, and J.E. Mertz. 2011. Transforming growth factor beta-induced reactivation of Epstein-Barr virus involves multiple Smad-binding elements cooperatively activating expression of the latent-lytic switch BZLF1 gene. *J. Virol.* 85:7836–7848. doi:10.1128/JVI.01197-10.

- Ilcus, C., C. Bagacean, A. Tempescul, C. Popescu, A. Parvu, M. Cenariu, C. Bocsan, and M. Zdrengea. 2017. Immune checkpoint blockade: the role of PD-1-PD-L axis in lymphoid malignancies. *OncoTargets Ther.* 10:2349–2363. doi:10.2147/OTT.S133385.
- Imadome, K.-I., M. Yajima, A. Arai, A. Nakazawa, F. Kawano, S. Ichikawa, N. Shimizu, N. Yamamoto, T. Morio, S. Ohga, H. Nakamura, M. Ito, O. Miura, J. Komano, and S. Fujiwara. 2011. Novel Mouse Xenograft Models Reveal a Critical Role of CD4+ T Cells in the Proliferation of EBV-Infected T and NK Cells. *PLOS Pathog.* 7:e1002326. doi:10.1371/journal.ppat.1002326.
- Imai, S., S. Koizumi, M. Sugiura, M. Tokunaga, Y. Uemura, N. Yamamoto, S. Tanaka, E. Sato, and T. Osato. 1994. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:9131–9135.
- Imai, S., M. Sugiura, O. Oikawa, S. Koizumi, M. Hirao, H. Kimura, H. Hayashibara, N. Terai, H. Tsutsumi, T. Oda, S. Chiba, and T. Osato. 1996. Epstein-Barr virus (EBV)-carrying and -expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood.* 87:1446–1457.
- Incrocci, R., L. Barse, A. Stone, S. Vagvala, M. Montesano, V. Subramaniam, and M. Swanson-Mungerson. 2017. Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) enhances IL-10 production through the activation of Bruton’s tyrosine kinase and STAT3. *Virology.* 500:96–102. doi:10.1016/j.virol.2016.10.015.
- Incrocci, R., M. McCormack, and M. Swanson-Mungerson. 2013. Epstein-Barr virus LMP2A increases IL-10 production in mitogen-stimulated primary B-cells and B-cell lymphomas. *J. Gen. Virol.* 94:1127–1133. doi:10.1099/vir.0.049221-0.
- Introne, W., R.E. Boissy, and W.A. Gahl. 1999. Clinical, molecular, and cell biological aspects of Chediak-Higashi syndrome. *Mol. Genet. Metab.* 68:283–303. doi:10.1006/mgme.1999.2927.
- Itoh, K., and S. Hirohata. 1995. The role of IL-10 in human B cell activation, proliferation, and differentiation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 154:4341–4350.
- Iwai, Y., J. Hamanishi, K. Chamoto, and T. Honjo. 2017. Cancer immunotherapies targeting the PD-1 signaling pathway. *J. Biomed. Sci.* 24:26. doi:10.1186/s12929-017-0329-9.
- Iwakiri, D. 2014. Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers.* 6:1615–1630. doi:10.3390/cancers6031615.
- Iwakiri, D., M. Samanta, and K. Takada. 2006. [Mechanisms of EBV-mediated oncogenesis].

Uirusu. 56:201–208.

Iwata, Y., T. Matsushita, M. Horikawa, D.J. Dilillo, K. Yanaba, G.M. Venturi, P.M. Szabolcs, S.H. Bernstein, C.M. Magro, A.D. Williams, R.P. Hall, E.W. St Clair, and T.F. Tedder. 2011. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*. 117:530–541. doi:10.1182/blood-2010-07-294249.

Iyer, S.S., and G. Cheng. 2012. Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Crit. Rev. Immunol.* 32:23–63.

Jacobson, C.A., and J.S. Abramson. 2012. HIV-Associated Hodgkin's Lymphoma: Prognosis and Therapy in the Era of cART. *Adv. Hematol.* 2012:507257. doi:10.1155/2012/507257.

Jaffe, E.S., and W.H. Wilson. 1997. Lymphomatoid granulomatosis: pathogenesis, pathology and clinical implications. *Cancer Surv.* 30:233–248.

Jahrsdörfer, B., C. Kaltenmeier, A. Gawanbacht, S. Lindner, T. Beyer, G. Härter, B. Grüner, P. Kern, F. Kirchhoff, and H. Schrezenmeier. 2013. HIV triggers interleukin 21-mediated induction of granzyme B-secreting B cells with T cell regulatory potential. (P1441). *J. Immunol.* 190:174.3-174.3.

Jarrett, R.F. 2002. Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 13 Suppl 1:23–29.

Jeong, Y.-I., S.-H. Hong, S.-H. Cho, M.Y. Park, and S.-E. Lee. 2016. Induction of IL-10-producing regulatory B cells following *Toxoplasma gondii* infection is important to the cyst formation. *Biochem. Biophys. Rep.* 7:91–97. doi:10.1016/j.bbrep.2016.05.008.

Jeong, Y.-I., S.-H. Hong, W.-J. Lee, S.-H. Cho, and S.-E. Lee. 2014. Regulatory B cell induction by *Toxoplasma gondii* infection implicate in host immune escape and suppression of allergic disease (MPF1P.770). *J. Immunol.* 192:66.9-66.9.

Jessen, B., S.F.N. Bode, S. Ammann, S. Chakravorty, G. Davies, J. Diestelhorst, M. Frei-Jones, W.A. Gahl, B.R. Gochuico, M. Griese, G. Griffiths, G. Janka, C. Klein, T. Kögl, K. Kurnik, K. Lehmborg, A. Maul-Pavicic, A.D. Mumford, D. Pace, N. Parvaneh, N. Rezaei, G. de Saint Basile, A. Schmitt-Graeff, K. Schwarz, G.T. Karasu, B. Zieger, U. Zur Stadt, P. Aichele, and S. Ehl. 2013. The risk of hemophagocytic lymphohistiocytosis in Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *Blood*. 121:2943–2951. doi:10.1182/blood-2012-10-463166.

Jiang, Y., Y. Li, and B. Zhu. 2015. T-cell exhaustion in the tumor microenvironment. *Cell Death Dis.* 6:e1792. doi:10.1038/cddis.2015.162.

Joab, I., J.C. Nicolas, G. Schwaab, G. de-Thé, B. Clause, M. Perricaudet, and Y. Zeng. 1991. Detection of anti-Epstein-Barr-virus transactivator (ZEBRA) antibodies in sera from patients

with nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer*. 48:647–649.

Jochum, S., A. Moosmann, S. Lang, W. Hammerschmidt, and R. Zeidler. 2012. The EBV immunoevasins vIL-10 and BNLF2a protect newly infected B cells from immune recognition and elimination. *PLoS Pathog*. 8:e1002704. doi:10.1371/journal.ppat.1002704.

Johannessen, I., S.M. Perera, A. Gallagher, P.A. Hopwood, J.A. Thomas, and D.H. Crawford. 2002. Expansion in scid mice of Epstein–Barr virus-associated post-transplantation lymphoproliferative disease biopsy material. *J. Gen. Virol*. 83:173–178. doi:10.1099/0022-1317-83-1-173.

Johansson, P., A. Jansson, U. Rüetschi, and L. Rymo. 2010. The p38 signaling pathway upregulates expression of the Epstein-Barr virus LMP1 oncogene. *J. Virol*. 84:2787–2797. doi:10.1128/JVI.01052-09.

Jones, J.F., S. Shurin, C. Abramowsky, R.R. Tubbs, C.G. Sciotto, R. Wahl, J. Sands, D. Gottman, B.Z. Katz, and J. Sklar. 1988. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N. Engl. J. Med*. 318:733–741. doi:10.1056/NEJM198803243181203.

Jud, A., M. Kotur, C. Berger, C. Gysin, D. Nadal, and A. Lünemann. 2017. Tonsillar CD56brightNKG2A+ NK cells restrict primary Epstein-Barr virus infection in B cells via IFN- γ . *Oncotarget*. 8:6130–6141. doi:10.18632/oncotarget.14045.

Kaiser, C., G. Laux, D. Eick, N. Jochner, G.W. Bornkamm, and B. Kempkes. 1999. The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol*. 73:4481–4484.

Kamekura, R., K. Shigehara, S. Miyajima, S. Jitsukawa, K. Kawata, K. Yamashita, T. Nagaya, A. Kumagai, A. Sato, H. Matsumiya, N. Ogasawara, N. Seki, K. Takano, Y. Kokai, H. Takahashi, T. Himi, and S. Ichimiya. 2015. Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin. Immunol. Orlando Fla*. 158:204–211. doi:10.1016/j.clim.2015.02.016.

Kamranvar, S.A., and M.G. Masucci. 2011. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes telomere dysfunction via induction of oxidative stress. *Leukemia*. 25:1017–1025. doi:10.1038/leu.2011.35.

Karin, M. 1999. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene*. 18:6867–6874. doi:10.1038/sj.onc.1203219.

Kasahara, Y., and A. Yachie. 2002. Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV)

in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 44:283–294.

Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg. 2010. Inflammatory bowel disease. *Annu. Rev. Immunol.* 28:573–621. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101225.

Katano, H., M.A. Ali, A.C. Patera, M. Catalfamo, E.S. Jaffe, H. Kimura, J.K. Dale, S.E. Straus, and J.I. Cohen. 2004. Chronic active Epstein-Barr virus infection associated with mutations in perforin that impair its maturation. *Blood.* 103:1244–1252. doi:10.1182/blood-2003-06-2171.

Katz, S.I., D. Parker, and J.L. Turk. 1974. B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. *Nature.* 251:550–551.

Kawa, K., A. Sawada, M. Sato, T. Okamura, N. Sakata, O. Kondo, T. Kimoto, K. Yamada, S. Tokimasa, M. Yasui, and M. Inoue. 2011. Excellent outcome of allogeneic hematopoietic SCT with reduced-intensity conditioning for the treatment of chronic active EBV infection. *Bone Marrow Transplant.* 46:77–83. doi:10.1038/bmt.2010.122.

Kawa-Ha, K., S. Ishihara, T. Ninomiya, K. Yumura-Yagi, J. Hara, F. Murayama, A. Tawa, and K. Hirai. 1989. CD3-negative lymphoproliferative disease of granular lymphocytes containing Epstein-Barr viral DNA. *J. Clin. Invest.* 84:51–55. doi:10.1172/JCI114168.

Kawashima, D., T. Kanda, T. Murata, S. Saito, A. Sugimoto, Y. Narita, and T. Tsurumi. 2013. Nuclear transport of Epstein-Barr virus DNA polymerase is dependent on the BMRF1 polymerase processivity factor and molecular chaperone Hsp90. *J. Virol.* 87:6482–6491. doi:10.1128/JVI.03428-12.

Kaye, K.M., O. Devergne, J.N. Harada, K.M. Izumi, R. Yalamanchili, E. Kieff, and G. Mosialos. 1996. Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:11085–11090.

Kehry, M.R. 1996. CD40-mediated signaling in B cells. Balancing cell survival, growth, and death. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 156:2345–2348.

Kelly, G., A. Bell, and A. Rickinson. 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat. Med.* 8:1098–1104. doi:10.1038/nm758.

Kelly, G.L., A.E. Milner, G.S. Baldwin, A.I. Bell, and A.B. Rickinson. 2006. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in c-myc-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14935–14940.

doi:10.1073/pnas.0509988103.

Kennedy, G., J. Komano, and B. Sugden. 2003. Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:14269–14274. doi:10.1073/pnas.2336099100.

Kerdiles, Y.M., D.R. Beisner, R. Tinoco, A.S. Dejean, D.H. Castrillon, R.A. DePinho, and S.M. Hedrick. 2009. Foxo1 links homing and survival of naive T cells by regulating L-selectin, CCR7 and interleukin 7 receptor. *Nat. Immunol.* 10:176–184. doi:10.1038/ni.1689.

Kessel, A., T. Haj, R. Peri, A. Snir, D. Melamed, E. Sabo, and E. Toubi. 2012. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun. Rev.* 11:670–677. doi:10.1016/j.autrev.2011.11.018.

Khan, A.R., E. Hams, A. Floudas, T. Sparwasser, C.T. Weaver, and P.G. Fallon. 2015. PD-L1hi B cells are critical regulators of humoral immunity. *Nat. Commun.* 6:5997. doi:10.1038/ncomms6997.

Khanna, R., D. Moss, and M. Gandhi. 2005. Technology insight: Applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Nat. Clin. Pract. Oncol.* 2:138–149. doi:10.1038/ncponc0107.

Khoder, A., A. Sarvaria, A. Alsuliman, C. Chew, T. Sekine, N. Cooper, S. Mielke, H. de Lavallade, M. Muftuoglu, I. Fernandez Curbelo, E. Liu, P.A. Muraro, A. Alousi, K. Stringaris, S. Parmar, N. Shah, H. Shaim, E. Yvon, J. Molldrem, R. Rouce, R. Champlin, I. McNiece, C. Mauri, E.J. Shpall, and K. Rezvani. 2014. Regulatory B cells are enriched within the IgM memory and transitional subsets in healthy donors but are deficient in chronic GVHD. *Blood.* 124:2034–2045. doi:10.1182/blood-2014-04-571125.

Kieser, A., E. Kilger, O. Gires, M. Ueffing, W. Kolch, and W. Hammerschmidt. 1997. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J.* 16:6478–6485. doi:10.1093/emboj/16.21.6478.

Kikuta, H., Y. Taguchi, K. Tomizawa, K. Kojima, N. Kawamura, A. Ishizaka, Y. Sakiyama, S. Matsumoto, S. Imai, and T. Kinoshita. 1988. Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature.* 333:455–457. doi:10.1038/333455a0.

Kim, J.H., W.S. Kim, J.Y. Hong, K.J. Ryu, S.J. Kim, and C. Park. 2016. Epstein-Barr virus EBNA2 directs doxorubicin resistance of B cell lymphoma through CCL3 and CCL4-mediated activation of NF- κ B and Btk. *Oncotarget.* doi:10.18632/oncotarget.14243.

- Kim, Y.S., G.B. Park, H.-K. Lee, H. Song, I.-H. Choi, W.J. Lee, and D.Y. Hur. 2008. Cross-linking of B7-H1 on EBV-transformed B cells induces apoptosis through reactive oxygen species production, JNK signaling activation, and fasL expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 181:6158–6169.
- Kimura, H., Y. Hoshino, H. Kanegane, I. Tsuge, T. Okamura, K. Kawa, and T. Morishima. 2001. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood.* 98:280–286.
- Kimura, H., T. Morishima, H. Kanegane, S. Ohga, Y. Hoshino, A. Maeda, S. Imai, M. Okano, T. Morio, S. Yokota, S. Tsuchiya, A. Yachie, S. Imashuku, K. Kawa, H. Wakiguchi, and Japanese Association for Research on Epstein-Barr Virus and Related Diseases. 2003. Prognostic factors for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J. Infect. Dis.* 187:527–533. doi:10.1086/367988.
- King, W., T. Dambaugh, M. Heller, J. Dowling, and E. Kieff. 1982. Epstein-Barr virus DNA XII. A variable region of the Epstein-Barr virus genome is included in the P3HR-1 deletion. *J. Virol.* 43:979–986.
- Kitagawa, N., M. Goto, K. Kurozumi, S. Maruo, M. Fukayama, T. Naoe, M. Yasukawa, K. Hino, T. Suzuki, S. Todo, and K. Takada. 2000. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J.* 19:6742–6750. doi:10.1093/emboj/19.24.6742.
- Kiyasu, J., H. Miyoshi, A. Hirata, F. Arakawa, A. Ichikawa, D. Niino, Y. Sugita, Y. Yufu, I. Choi, Y. Abe, N. Uike, K. Nagafuji, T. Okamura, K. Akashi, R. Takayanagi, M. Shiratsuchi, and K. Ohshima. 2015. Expression of programmed cell death ligand 1 is associated with poor overall survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 126:2193–2201. doi:10.1182/blood-2015-02-629600.
- Kleffel, S., A. Vergani, S. Tezza, M. Ben Nasr, M.A. Niewczas, S. Wong, R. Bassi, F. D'Addio, T. Schatton, R. Abdi, M. Atkinson, M.H. Sayegh, L. Wen, C.H. Wasserfall, K.C. O'Connor, and P. Fiorina. 2015. Interleukin-10+ regulatory B cells arise within antigen-experienced CD40+ B cells to maintain tolerance to islet autoantigens. *Diabetes.* 64:158–171. doi:10.2337/db13-1639.
- Klenerman, P., V. Cerundolo, and P.R. Dunbar. 2002. Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nat. Rev. Immunol.* 2:263–272. doi:10.1038/nri777.
- Ko, Y.-H. 2015. EBV and human cancer. *Exp. Mol. Med.* 47:e130. doi:10.1038/emm.2014.109.

- Kotb, A., A. Klippert, M. Daskalaki, U. Sauermann, C. Stahl-Hennig, and B. Neumann. 2017. Elevated granzyme B(+) B-cell level in SIV-infection correlate with viral load and low CD4 T-cell count. *Immunol. Cell Biol.* 95:316–320. doi:10.1038/icb.2016.96.
- Kretschmer, K., I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, and H. von Boehmer. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* 6:1219–1227. doi:10.1038/ni1265.
- Kronenberg, M., M. Steinmetz, J. Kobori, E. Kraig, J.A. Kapp, C.W. Pierce, C.M. Sorensen, G. Suzuki, T. Tada, and L. Hood. 1983. RNA transcripts for I-J polypeptides are apparently not encoded between the I-A and I-E subregions of the murine major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:5704–5708.
- Krzewski, K., and A.R. Cullinane. 2013. Evidence for defective Rab GTPase-dependent cargo traffic in immune disorders. *Exp. Cell Res.* 319:2360–2367. doi:10.1016/j.yexcr.2013.06.012.
- Kudoh, A., M. Fujita, T. Kiyono, K. Kuzushima, Y. Sugaya, S. Izuta, Y. Nishiyama, and T. Tsurumi. 2003. Reactivation of lytic replication from B cells latently infected with Epstein-Barr virus occurs with high S-phase cyclin-dependent kinase activity while inhibiting cellular DNA replication. *J. Virol.* 77:851–861.
- Kudoh, A., S. Iwahori, Y. Sato, S. Nakayama, H. Isomura, T. Murata, and T. Tsurumi. 2009. Homologous recombinational repair factors are recruited and loaded onto the viral DNA genome in Epstein-Barr virus replication compartments. *J. Virol.* 83:6641–6651. doi:10.1128/JVI.00049-09.
- Kukhanova, M.K., A.N. Korovina, and S.N. Kochetkov. 2014. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochem. Biokhimiia.* 79:1635–1652. doi:10.1134/S0006297914130124.
- Küppers, R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* 3:801–812. doi:10.1038/nri1201.
- Küppers, R. 2009. The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat. Rev. Cancer.* 9:15–27. doi:10.1038/nrc2542.
- Kutok, J.L., and F. Wang. 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu. Rev. Pathol.* 1:375–404. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100209.
- La Paglia, G.M.C., M.C. Leone, G. Lepri, R. Vagelli, E. Valentini, A. Alunno, and C. Tani. 2017. One year in review 2017: systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 35:551–561.
- LaCasce, A.S. 2006. Post-Transplant Lymphoproliferative Disorders. *The Oncologist.*

11:674–680. doi:10.1634/theoncologist.11-6-674.

Laherty, C.D., H.M. Hu, A.W. Opipari, F. Wang, and V.M. Dixit. 1992. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J. Biol. Chem.* 267:24157–24160.

Laing, K.G., A. Elia, I. Jeffrey, V. Matys, V.J. Tilleray, B. Souberbielle, and M.J. Clemens. 2002. In vivo effects of the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 on protein synthesis and cell growth regulation. *Virology.* 297:253–269.

Lam, L.T., G. Wright, R.E. Davis, G. Lenz, P. Farinha, L. Dang, J.W. Chan, A. Rosenwald, R.D. Gascoyne, and L.M. Staudt. 2008. Cooperative signaling through the signal transducer and activator of transcription 3 and nuclear factor- κ B pathways in subtypes of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 111:3701–3713. doi:10.1182/blood-2007-09-111948.

Lam, N., and B. Sugden. 2003. CD40 and its viral mimic, LMP1: similar means to different ends. *Cell. Signal.* 15:9–16.

Lambert, S.L., and O.M. Martinez. 2007. Latent membrane protein 1 of EBV activates phosphatidylinositol 3-kinase to induce production of IL-10. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 179:8225–8234.

Lampropoulou, V., K. Hoehlig, T. Roch, P. Neves, E. Calderón Gómez, C.H. Sweenie, Y. Hao, A.A. Freitas, U. Steinhoff, S.M. Anderton, and S. Fillatreau. 2008. TLR-activated B cells suppress T cell-mediated autoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 180:4763–4773.

Latour, S. 2007. Natural killer T cells and X-linked lymphoproliferative syndrome. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 7:510–514. doi:10.1097/ACI.0b013e3282f1bad6.

Latour, S., R. Roncagalli, R. Chen, M. Bakinowski, X. Shi, P.L. Schwartzberg, D. Davidson, and A. Veillette. 2003. Binding of SAP SH2 domain to FynT SH3 domain reveals a novel mechanism of receptor signalling in immune regulation. *Nat. Cell Biol.* 5:149–154. doi:10.1038/ncb919.

Le Clorenec, C., I. Youlyouz-Marfak, E. Adriaenssens, J. Coll, G.W. Bornkamm, and J. Feuillard. 2006. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood.* 107:2070–2078. doi:10.1182/blood-2005-05-2053.

Le Roux, A., B. Kerdiles, D. Walls, J.F. Dedieu, and M. Perricaudet. 1994. The Epstein-Barr virus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology.* 205:596–602. doi:10.1006/viro.1994.1687.

- Lee, K.M., R.T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M.M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, S. Deng, H. Yeh, J.F. Markmann, and J.I. Kim. 2014a. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 44:1728–1736. doi:10.1002/eji.201344062.
- Lee, K.M., R.T. Stott, G. Zhao, J. SooHoo, W. Xiong, M.M. Lian, L. Fitzgerald, S. Shi, E. Akrawi, J. Lei, S. Deng, H. Yeh, J.F. Markmann, and J.I. Kim. 2014b. TGF- β -producing regulatory B cells induce regulatory T cells and promote transplantation tolerance. *Eur. J. Immunol.* 44:1728–1736. doi:10.1002/eji.201344062.
- Lerner, M.R., N.C. Andrews, G. Miller, and J.A. Steitz. 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:805–809.
- Leroy, B., L. Gillet, A. Vanderplassen, and R. Wattiez. 2016. Structural Proteomics of Herpesviruses. *Viruses.* 8. doi:10.3390/v8020050.
- Levin, L.I., E.C. Breen, B.M. Birmann, J.L. Batista, L.I. Magpantay, Y. Li, R.F. Ambinder, N.E. Mueller, and O. Martínez-Maza. 2017. Elevated serum levels of sCD30 and IL-6 and detectable IL-10 precede classical Hodgkin lymphoma diagnosis. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. Publ. Am. Assoc. Cancer Res. Cosponsored Am. Soc. Prev. Oncol.* doi:10.1158/1055-9965.EPI-16-1012.
- Lewis, J., L.J. Eiben, D.L. Nelson, J.I. Cohen, K.E. Nichols, H.D. Ochs, L.D. Notarangelo, and C.S. Duckett. 2001. Distinct Interactions of the X-Linked Lymphoproliferative Syndrome Gene Product SAP with Cytoplasmic Domains of Members of the CD2 Receptor Family. *Clin. Immunol.* 100:15–23. doi:10.1006/clim.2001.5035.
- Li, F.-Y., B. Chaigne-Delalande, C. Kanellopoulou, J.C. Davis, H.F. Matthews, D.C. Douek, J.I. Cohen, G. Uzel, H.C. Su, and M.J. Lenardo. 2011. Second messenger role for Mg²⁺ revealed by human T-cell immunodeficiency. *Nature.* 475:471–476. doi:10.1038/nature10246.
- Li, F.-Y., B. Chaigne-Delalande, H. Su, G. Uzel, H. Matthews, and M.J. Lenardo. 2014. XMEN disease: a new primary immunodeficiency affecting Mg²⁺ regulation of immunity against Epstein-Barr virus. *Blood.* 123:2148–2152. doi:10.1182/blood-2013-11-538686.
- Li, Q., M.K. Spriggs, S. Kovats, S.M. Turk, M.R. Comeau, B. Nepom, and L.M. Hutt-Fletcher. 1997. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J. Virol.* 71:4657–4662.
- Li, Z., P. Dong, M. Ren, Y. Song, X. Qian, Y. Yang, S. Li, X. Zhang, and F. Liu. 2016. PD-

L1 Expression Is Associated with Tumor FOXP3+ Regulatory T-Cell Infiltration of Breast Cancer and Poor Prognosis of Patient. *J. Cancer*. 7:784–793. doi:10.7150/jca.14549.

Liang, C.-L., J.-L. Chen, Y.-P.P. Hsu, J.T. Ou, and Y.-S. Chang. 2002. Epstein-Barr virus BZLF1 gene is activated by transforming growth factor-beta through cooperativity of Smads and c-Jun/c-Fos proteins. *J. Biol. Chem.* 277:23345–23357. doi:10.1074/jbc.M107420200.

Lin, M.-C., Y.-C. Lin, S.-T. Chen, T.-H. Young, and P.-J. Lou. 2017. Therapeutic vaccine targeting Epstein-Barr virus latent protein, LMP1, suppresses LMP1-expressing tumor growth and metastasis in vivo. *BMC Cancer*. 17:18. doi:10.1186/s12885-016-3027-1.

Linden, J., and C. Cekic. 2012. Regulation of Lymphocyte Function by Adenosine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32:2097–2103. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226837.

Lindner, S., K. Dahlke, K. Sontheimer, M. Hagn, C. Kaltenmeier, T.F.E. Barth, T. Beyer, F. Reister, D. Fabricius, R. Lotfi, O. Lunov, G.U. Nienhaus, T. Simmet, R. Kreienberg, P. Möller, H. Schrezenmeier, and B. Jahrsdörfer. 2013. Interleukin 21-induced granzyme B-expressing B cells infiltrate tumors and regulate T cells. *Cancer Res.* 73:2468–2479. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3450.

Ling, P.D., R.S. Peng, A. Nakajima, J.H. Yu, J. Tan, S.M. Moses, W.-H. Yang, B. Zhao, E. Kieff, K.D. Bloch, and D.B. Bloch. 2005. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24:3565–3575. doi:10.1038/sj.emboj.7600820.

Linka, R.M., S.L. Risse, K. Bienemann, M. Werner, Y. Linka, F. Krux, C. Synaeve, R. Deenen, S. Ginzl, R. Dvorsky, M. Gombert, A. Halenius, R. Hartig, M. Helminen, A. Fischer, P. Stepensky, K. Vettenranta, K. Köhrer, M.R. Ahmadian, H.-J. Laws, B. Fleckenstein, H. Jumaa, S. Latour, B. Schraven, and A. Borkhardt. 2012. Loss-of-function mutations within the IL-2 inducible kinase ITK in patients with EBV-associated lymphoproliferative diseases. *Leukemia*. 26:963–971. doi:10.1038/leu.2011.371.

Liu, B.-S., Y. Cao, T.W. Huizinga, D.A. Hafler, and R.E.M. Toes. 2014a. TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells. *Eur. J. Immunol.* 44:2121–2129. doi:10.1002/eji.201344341.

Liu, R.-Y., R.-Y. Liu, Y. Zeng, Y. Zeng, Z. Lei, Z. Lei, L. Wang, L. Wang, H. Yang, H. Yang, Z. Liu, Z. Liu, J. Zhao, J. Zhao, H.-T. Zhang, and H.-T. Zhang. 2014b. JAK/STAT3 signaling is required for TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int. J. Oncol.* 44:1643–1651.

Liu, X., X. Tang, S. Zhang, Y. Wang, X. Wang, C. Zhao, and B. Luo. 2012. Methylation and

Expression of Retinoblastoma and Transforming Growth Factor- β 1 Genes in Epstein-Barr Virus-Associated and -Negative Gastric Carcinomas. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012:906017. doi:10.1155/2012/906017.

Liu, Y., L.-S. Cheng, S. Wu, S.-Q. Wang, L. Li, W.-M. She, J. Li, J.-Y. Wang, and W. Jiang. 2016a. IL-10-producing regulatory B-cells suppressed effector T-cells but enhanced regulatory T-cells in chronic HBV infection. *Clin. Sci. Lond. Engl.* 1979. 130:907–919. doi:10.1042/CS20160069.

Liu, Y., H. Wang, X. Hu, Z. Qu, H. Zhang, R. Crew, D.A. Ayana, M. Li, J. Qiu, and Y. Jiang. 2016b. A higher frequency of IL-10-producing B cells in Hepatitis B virus-associated membranous nephropathy. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 43:417–427. doi:10.1111/1440-1681.12552.

Long, H.M., O.L. Chagoury, A.M. Leese, G.B. Ryan, E. James, L.T. Morton, R.J.M. Abbott, S. Sabbah, W. Kwok, and A.B. Rickinson. 2013. MHC II tetramers visualize human CD4+ T cell responses to Epstein-Barr virus infection and demonstrate atypical kinetics of the nuclear antigen EBNA1 response. *J. Exp. Med.* 210:933–949. doi:10.1084/jem.20121437.

López-Botet, M., J.J. Pérez-Villar, M. Carretero, A. Rodríguez, I. Melero, T. Bellón, M. Llano, and F. Navarro. 1997. Structure and function of the CD94 C-type lectin receptor complex involved in recognition of HLA class I molecules. *Immunol. Rev.* 155:165–174.

Lotz, M., C.D. Tsoukas, S. Fong, D.A. Carson, and J.H. Vaughan. 1985. Regulation of Epstein-Barr virus infection by recombinant interferons. Selected sensitivity to interferon-gamma. *Eur. J. Immunol.* 15:520–525. doi:10.1002/eji.1830150518.

Lu, J., M. Murakami, S.C. Verma, Q. Cai, S. Haldar, R. Kaul, M.A. Wasik, J. Middeldorp, and E.S. Robertson. 2011. Epstein-Barr Virus nuclear antigen 1 (EBNA1) confers resistance to apoptosis in EBV-positive B-lymphoma cells through up-regulation of survivin. *Virology.* 410:64–75. doi:10.1016/j.virol.2010.10.029.

Lucchesi, W., G. Brady, O. Dittrich-Breiholz, M. Kracht, R. Russ, and P.J. Farrell. 2008. Differential Gene Regulation by Epstein-Barr Virus Type 1 and Type 2 EBNA2. *J. Virol.* 82:7456–7466. doi:10.1128/JVI.00223-08.

Lünemann, A., L.D. Vanoaica, T. Azzi, D. Nadal, and C. Münz. 2013. A distinct subpopulation of human NK cells restricts B cell transformation by EBV. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 191:4989–4995. doi:10.4049/jimmunol.1301046.

Lykens, J.E., C.E. Terrell, E.E. Zoller, K. Risma, and M.B. Jordan. 2011. Perforin is a critical physiologic regulator of T-cell activation. *Blood.* 118:618–626. doi:10.1182/blood-2010-12-

324533.

Ma, L., B. Liu, Z. Jiang, and Y. Jiang. 2014. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* 33:187–195. doi:10.1007/s10067-013-2359-3.

Ma, Y., L. Chen, G. Xie, Y. Zhou, C. Yue, X. Yuan, Y. Zheng, W. Wang, L. Deng, and L. Shen. 2016. Elevated level of interleukin-35 in colorectal cancer induces conversion of T cells into iT_{reg}35 by activating STAT1/STAT3. *Oncotarget.* 7:73003–73015. doi:10.18632/oncotarget.12193.

Maakaroun, N.R., A. Moanna, J.T. Jacob, and H. Albrecht. 2010. Viral infections associated with haemophagocytic syndrome. *Rev. Med. Virol.* 20:93–105. doi:10.1002/rmv.638.

Macswen, K.F., and D.H. Crawford. 2003. Epstein-Barr virus-recent advances. *Lancet Infect. Dis.* 3:131–140.

Madisen, L., N.R. Webb, T.M. Rose, H. Marquardt, T. Ikeda, D. Twardzik, S. Seyedin, and A.F. Purchio. 1988. Transforming growth factor-beta 2: cDNA cloning and sequence analysis. *DNA Mary Ann Liebert Inc.* 7:1–8. doi:10.1089/dna.1988.7.1.

Mamishi, S., M.H. Modarressi, B. Pourakbari, B. Tamizifar, F. Mahjoub, A. Fahimzad, S. Alyasin, M.H. Bemanian, A.A. Hamidiyeh, M.R. Fazlollahi, M.R. Ashrafi, A. Isaeian, G. Khotaei, M. Yeganeh, and N. Parvaneh. 2008. Analysis of RAB27A gene in griscelli syndrome type 2: novel mutations including a deletion hotspot. *J. Clin. Immunol.* 28:384–389. doi:10.1007/s10875-008-9192-5.

Mancao, C., and W. Hammerschmidt. 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood.* 110:3715–3721. doi:10.1182/blood-2007-05-090142.

Mandapathil, M., B. Hilldorfer, M.J. Szczepanski, M. Czystowska, M. Szajnik, J. Ren, S. Lang, E.K. Jackson, E. Gorelik, and T.L. Whiteside. 2010. Generation and Accumulation of Immunosuppressive Adenosine by Human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ Regulatory T Cells. *J. Biol. Chem.* 285:7176–7186. doi:10.1074/jbc.M109.047423.

Mann, M.K., K. Maresz, L.P. Shriver, Y. Tan, and B.N. Dittel. 2007. B cell regulation of CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 178:3447–3456.

Mannick, J.B., J.I. Cohen, M. Birkenbach, A. Marchini, and E. Kieff. 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J. Virol.* 65:6826–6837.

- Mannino, M.H., Z. Zhu, H. Xiao, Q. Bai, M.R. Wakefield, and Y. Fang. 2015. The paradoxical role of IL-10 in immunity and cancer. *Cancer Lett.* 367:103–107. doi:10.1016/j.canlet.2015.07.009.
- Mansouri, D., S.A. Mahdavian, S. Khalilzadeh, S.A. Mohajerani, M. Hasanzad, S. Sadr, S.A. Nadji, S. Karimi, A. Droodinia, N. Rezaei, R.M. Linka, K. Bienemann, A. Borkhardt, M.R. Masjedi, and A.A. Velayati. 2012. IL-2-inducible T-cell kinase deficiency with pulmonary manifestations due to disseminated Epstein-Barr virus infection. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 158:418–422. doi:10.1159/000333472.
- Mao, Y., M.P. Lu, H. Lin, D.W. Zhang, Y. Liu, Q.D. Li, Z.G. Lv, J.R. Xu, R.J. Chen, and J. Zhu. 2013. Prognostic significance of EBV latent membrane protein 1 expression in lymphomas: evidence from 15 studies. *PloS One.* 8:e60313. doi:10.1371/journal.pone.0060313.
- Marquitz, A.R., A. Mathur, P.E. Chugh, D.P. Dittmer, and N. Raab-Traub. 2014. Expression profile of microRNAs in Epstein-Barr virus-infected AGS gastric carcinoma cells. *J. Virol.* 88:1389–1393. doi:10.1128/JVI.02662-13.
- Marquitz, A.R., and N. Raab-Traub. 2012. The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin. Cancer Biol.* 22:166–172. doi:10.1016/j.semcancer.2011.12.001.
- Marsh, R.A., M.B. Jordan, and A.H. Filipovich. 2011. Reduced-intensity conditioning haematopoietic cell transplantation for haemophagocytic lymphohistiocytosis: an important step forward. *Br. J. Haematol.* 154:556–563. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.08785.x.
- Marsh, R.A., L. Madden, B.J. Kitchen, R. Mody, B. McClimon, M.B. Jordan, J.J. Bleesing, K. Zhang, and A.H. Filipovich. 2010. XIAP deficiency: a unique primary immunodeficiency best classified as X-linked familial hemophagocytic lymphohistiocytosis and not as X-linked lymphoproliferative disease. *Blood.* 116:1079–1082. doi:10.1182/blood-2010-01-256099.
- Marsh, R.A., K. Rao, P. Satwani, K. Lehmborg, I. Müller, D. Li, M.-O. Kim, A. Fischer, S. Latour, P. Sedlacek, V. Barlogis, K. Hamamoto, H. Kanegane, S. Milanovich, D.A. Margolis, D. Dimmock, J. Casper, D.N. Douglas, P.J. Amrolia, P. Veys, A.R. Kumar, M.B. Jordan, J.J. Bleesing, and A.H. Filipovich. 2013. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for XIAP deficiency: an international survey reveals poor outcomes. *Blood.* 121:877–883. doi:10.1182/blood-2012-06-432500.
- Matsumoto, M., A. Baba, T. Yokota, H. Nishikawa, Y. Ohkawa, H. Kayama, A. Kallies, S.L. Nutt, S. Sakaguchi, K. Takeda, T. Kurosaki, and Y. Baba. 2014. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. *Immunity.* 41:1040–

1051. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.016.

Matsushita, T., M. Horikawa, Y. Iwata, and T.F. Tedder. 2010. Regulatory B cells (B10 cells) and regulatory T cells have independent roles in controlling experimental autoimmune encephalomyelitis initiation and late-phase immunopathogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 185:2240–2252. doi:10.4049/jimmunol.1001307.

Matsushita, T., K. Yanaba, J.-D. Bouaziz, M. Fujimoto, and T.F. Tedder. 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* 118:3420–3430. doi:10.1172/JCI36030.

Mauri, C., and A. Bosma. 2012. Immune regulatory function of B cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30:221–241. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074934.

Mauri, C., D. Gray, N. Mushtaq, and M. Londei. 2003. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. *J. Exp. Med.* 197:489–501.

Mauri, C., and M. Menon. 2015a. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* 27:479–486. doi:10.1093/intimm/dxv038.

Mauri, C., and M. Menon. 2015b. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.* 27:479–486. doi:10.1093/intimm/dxv038.

Mauri, C., and M. Menon. 2017. Human regulatory B cells in health and disease: therapeutic potential. *J. Clin. Invest.* 127:772–779. doi:10.1172/JCI85113.

McLaughlin-Drubin, M.E., and K. Munger. 2008. Viruses Associated with Human Cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1782:127–150. doi:10.1016/j.bbadis.2007.12.005.

McNally, J.M., and R.M. Welsh. 2002. Bystander T cell activation and attrition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 263:29–41.

Meckes, D.G. 2015. Exosomal Communication Goes Viral. *J. Virol.* 89:5200–5203. doi:10.1128/JVI.02470-14.

Menard, L., T. Cantaert, N. Chamberlain, S.G. Tangye, S. Riminton, J.A. Church, A. Klion, C. Cunningham-Rundles, K.E. Nichols, and E. Meffre. 2014. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)/SLAM-associated protein pathway regulates human B-cell tolerance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 133:1149–1161. doi:10.1016/j.jaci.2013.10.051.

Ménasché, G., J. Feldmann, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2005. Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis. *Immunol. Rev.* 203:165–179. doi:10.1111/j.0105-2896.2005.00224.x.

Ménasché, G., E. Pastural, J. Feldmann, S. Certain, F. Ersoy, S. Dupuis, N. Wulffraat, D. Bianchi, A. Fischer, F. Le Deist, and G. de Saint Basile. 2000. Mutations in RAB27A cause

Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat. Genet.* 25:173–176. doi:10.1038/76024.

Menon, M., P.A. Blair, D.A. Isenberg, and C. Mauri. 2016. A Regulatory Feedback between Plasmacytoid Dendritic Cells and Regulatory B Cells Is Aberrant in Systemic Lupus Erythematosus. *Immunity.* 44:683–697. doi:10.1016/j.immuni.2016.02.012.

Mesri, E.A., M.A. Feitelson, and K. Munger. 2014. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. *Cell Host Microbe.* 15:266–282. doi:10.1016/j.chom.2014.02.011.

Middeldorp, J.M., A.A.T.P. Brink, A.J.C. van den Brule, and C.J.L.M. Meijer. 2003. Pathogenic roles for Epstein-Barr virus (EBV) gene products in EBV-associated proliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 45:1–36.

Miles, R.R., S. Arnold, and M.S. Cairo. 2012. Risk factors and treatment of childhood and adolescent Burkitt lymphoma/leukaemia. *Br. J. Haematol.* 156:730–743. doi:10.1111/j.1365-2141.2011.09024.x.

Miller, G., J. Robinson, L. Heston, and M. Lipman. 1974. Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 71:4006–4010.

Miller, I.G., and A. El-Guindy. 2002. Regulation of Epstein-Barr Virus Lytic Cycle Activation in Malignant and Nonmalignant Disease. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 94:1733–1735. doi:10.1093/jnci/94.23.1733.

Miyauchi, K., E. Urano, H. Yoshiyama, and J. Komano. 2011. Cytokine signatures of transformed B cells with distinct Epstein-Barr virus latencies as a potential diagnostic tool for B cell lymphoma. *Cancer Sci.* 102:1236–1241. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.01924.x.

Miyazaki, I., R.K. Cheung, and H.M. Dosch. 1993. Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 178:439–447.

Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R.S. Blumberg, and A.K. Bhan. 2002. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity.* 16:219–230.

Mizoguchi, E., A. Mizoguchi, F.I. Preffer, and A.K. Bhan. 2000. Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease. *Int. Immunol.* 12:597–605.

Molesworth, S.J., C.M. Lake, C.M. Borza, S.M. Turk, and L.M. Hutt-Fletcher. 2000. Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J. Virol.* 74:6324–6332.

Montpellier, C., P. Crepieux, B. Quatannens, B. Delobel, M. Croquette, D. Stehelin, C.

Auriault, H. Groux, and J. Coll. 1997. Homologous T and B cells immortalized in vitro by the Epstein-Barr virus exhibit differential genetical and functional features. *Int. J. Oncol.* 11:87–96.

Moore, M.D., R.G. DiScipio, N.R. Cooper, and G.R. Nemerow. 1989. Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J. Biol. Chem.* 264:20576–20582.

Moralès, O., S. Depil, D. Mrizak, N. Martin, P.A. Ndour, F. Dufosse, C. Miroux, J. Coll, Y. de Launoit, C. Auriault, V. Pancre, and N. Delhem. 2012. EBV Latency II-derived peptides induce a specific CD4+ cytotoxic T-cell activity and not a CD4+ regulatory T-cell response. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997.* 35:254–266. doi:10.1097/CJI.0b013e31824d72c5.

Morris, M.A., C.W. Dawson, L. Laverick, A.M. Davis, J.P.R. Dudman, S. Raveenthiraraj, Z. Ahmad, L.-F. Yap, and L.S. Young. 2016. The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF β and β 1 integrin signalling. *Sci. Rep.* 6:19533. doi:10.1038/srep19533.

Morrissey, P.J., K. Charrier, S. Braddy, D. Liggitt, and J.D. Watson. 1993. CD4+ T cells that express high levels of CD45RB induce wasting disease when transferred into congenic severe combined immunodeficient mice. Disease development is prevented by cotransfer of purified CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 178:237–244.

Moshous, D., E. Martin, W. Carpentier, A. Lim, I. Callebaut, D. Canioni, F. Hauck, J. Majewski, J. Schwartzentruber, P. Nitschke, N. Sirvent, P. Frange, C. Picard, S. Blanche, P. Revy, A. Fischer, S. Latour, N. Jabado, and J.-P. de Villartay. 2013. Whole-exome sequencing identifies Coronin-1A deficiency in 3 siblings with immunodeficiency and EBV-associated B-cell lymphoproliferation. *J. Allergy Clin. Immunol.* 131:1594–1603. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.042.

Mounier, N., M. Spina, and J.P. Spano. 2010. Hodgkin lymphoma in HIV positive patients. *Curr. HIV Res.* 8:141–146.

Mueller, N.E., E.T. Lennette, K. Dupnik, and B.M. Birmann. 2012. Antibody titers against EBNA1 and EBNA2 in relation to Hodgkin lymphoma and history of infectious mononucleosis. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer.* 130:2886–2891. doi:10.1002/ijc.26334.

Mueller, P., X. Liu, and J. Pieters. 2011. Migration and homeostasis of naive T cells depends on coronin 1-mediated prosurvival signals and not on coronin 1-dependent filamentous actin modulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 186:4039–4050. doi:10.4049/jimmunol.1003352.

Mugnier, B., B. Nal, C. Verthuy, C. Boyer, D. Lam, L. Chasson, V. Nieoullon, G. Chazal, X.-

- J. Guo, H.-T. He, D. Rueff-Juy, A. Alcover, and P. Ferrier. 2008. Coronin-1A links cytoskeleton dynamics to TCR alpha beta-induced cell signaling. *PloS One*. 3:e3467. doi:10.1371/journal.pone.0003467.
- Munn, D.H., E. Shafizadeh, J.T. Attwood, I. Bondarev, A. Pashine, and A.L. Mellor. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* 189:1363–1372.
- Munn, D.H., M.D. Sharma, D. Hou, B. Baban, J.R. Lee, S.J. Antonia, J.L. Messina, P. Chandler, P.A. Koni, and A.L. Mellor. 2004. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J. Clin. Invest.* 114:280–290. doi:10.1172/JCI21583.
- Münz, C., K.L. Bickham, M. Subklewe, M.L. Tsang, A. Chahroudi, M.G. Kurilla, D. Zhang, M. O'Donnell, and R.M. Steinman. 2000. Human CD4(+) T lymphocytes consistently respond to the latent Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA1. *J. Exp. Med.* 191:1649–1660.
- Murata, T. 2014. Regulation of Epstein-Barr virus reactivation from latency. *Microbiol. Immunol.* 58:307–317. doi:10.1111/1348-0421.12155.
- Muti, G., C. Klersy, F. Baldanti, S. Granata, P. Oreste, L. Pezzetti, M. Gatti, L. Gargantini, M. Caramella, V. Mancini, G. Gerna, and E. Morra. 2003a. Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 122:927–933.
- Muti, G., C. Klersy, F. Baldanti, S. Granata, P. Oreste, L. Pezzetti, M. Gatti, L. Gargantini, M. Caramella, V. Mancini, G. Gerna, E. Morra, and Co-operative Study Group on PTLDS. 2003b. Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in EBV-positive and EBV-negative post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 122:927–933.
- Muti, G., V. Mancini, E. Ravelli, and E. Morra. 2005. Significance of Epstein-Barr virus (EBV) load and interleukin-10 in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Leuk. Lymphoma*. 46:1397–1407. doi:10.1080/10428190500160272.
- Najjar, I., F. Baran-Marszak, C. Le Clorenec, C. Laguillier, O. Schischmanoff, I. Youlyouz-Marfak, M. Schlee, G.W. Bornkamm, M. Raphaël, J. Feuillard, and R. Fagard. 2005. Latent membrane protein 1 regulates STAT1 through NF-kappaB-dependent interferon secretion in Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *J. Virol.* 79:4936–4943. doi:10.1128/JVI.79.8.4936-4943.2005.
- Nakagomi, H., R. Dolcetti, M.T. Bejarano, P. Pisa, R. Kiessling, and M.G. Masucci. 1994.

The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) induces interleukin-10 production in Burkitt lymphoma lines. *Int. J. Cancer*. 57:240–244. doi:10.1002/ijc.2910570218.

Nanbo, A., K. Inoue, K. Adachi-Takasawa, and K. Takada. 2002. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J*. 21:954–965. doi:10.1093/emboj/21.5.954.

Nanbo, A., E. Kawanishi, R. Yoshida, and H. Yoshiyama. 2013. Exosomes Derived from Epstein-Barr Virus-Infected Cells Are Internalized via Caveola-Dependent Endocytosis and Promote Phenotypic Modulation in Target Cells. *J. Virol*. 87:10334–10347. doi:10.1128/JVI.01310-13.

Narita, Y., T. Murata, A. Ryo, D. Kawashima, A. Sugimoto, T. Kanda, H. Kimura, and T. Tsurumi. 2013. Pin1 Interacts with the Epstein-Barr Virus DNA Polymerase Catalytic Subunit and Regulates Viral DNA Replication. *J. Virol*. 87:2120–2127. doi:10.1128/JVI.02634-12.

Nastoupil, L.J., R. Sinha, and C.R. Flowers. 2012. Management Strategies for Elderly Patients with Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Eur. Oncol. Haematol*. 8:123–126.

Nehme, N.T., J.P. Schmid, F. Debeurme, I. André-Schmutz, A. Lim, P. Nitschke, F. Rieux-Laucat, P. Lutz, C. Picard, N. Mahlaoui, A. Fischer, and G. de Saint Basile. 2012. MST1 mutations in autosomal recessive primary immunodeficiency characterized by defective naive T-cell survival. *Blood*. 119:3458–3468. doi:10.1182/blood-2011-09-378364.

Nemerow, G.R., C. Mold, V.K. Schwend, V. Tollefson, and N.R. Cooper. 1987. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J. Virol*. 61:1416–1420.

Neta, R., and S.B. Salvin. 1974. Specific suppression of delayed hypersensitivity: the possible presence of a suppressor B cell in the regulation of delayed hypersensitivity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 113:1716–1725.

Neves, P., V. Lampropoulou, E. Calderon-Gomez, T. Roch, U. Stervbo, P. Shen, A.A. Kühl, C. Loddenkemper, M. Haury, S.A. Nedospasov, S.H.E. Kaufmann, U. Steinhoff, D.P. Calado, and S. Fillatreau. 2010. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during *Salmonella typhimurium* infection. *Immunity*. 33:777–790. doi:10.1016/j.immuni.2010.10.016.

Newell, K.A., A. Asare, A.D. Kirk, T.D. Gisler, K. Bourcier, M. Suthanthiran, W.J. Burlingham, W.H. Marks, I. Sanz, R.I. Lechler, M.P. Hernandez-Fuentes, L.A. Turka, and

- V.L. Seyfert-Margolis. 2010. Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* 120:1836–1847. doi:10.1172/JCI39933.
- Nichols, K.E., D.P. Harkin, S. Levitz, M. Krainer, K.A. Kolquist, C. Genovese, A. Bernard, M. Ferguson, L. Zuo, E. Snyder, A.J. Buckler, C. Wise, J. Ashley, M. Lovett, M.B. Valentine, A.T. Look, W. Gerald, D.E. Housman, and D.A. Haber. 1998. Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:13765–13770.
- Niederman, J.C., R.W. McCollum, G. Henle, and W. Henle. 1968. Infectious mononucleosis. Clinical manifestations in relation to EB virus antibodies. *JAMA.* 203:205–209.
- Nikiforow, S. 2015. The Role of Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Treatment of Hemophagocytic Lymphohistiocytosis. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 29:943–959. doi:10.1016/j.hoc.2015.06.011.
- Nishikura, K., A. ar-Rushdi, J. Erikson, R. Watt, G. Rovera, and C.M. Croce. 1983. Differential expression of the normal and of the translocated human c-myc oncogenes in B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80:4822–4826.
- Noble, A., A. Giorgini, and J.A. Leggat. 2006. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage. *Blood.* 107:4475–4483. doi:10.1182/blood-2005-10-3994.
- Noh, J., J.H. Lee, G. Noh, S.Y. Bang, H.S. Kim, W.S. Choi, S. Cho, and S.S. Lee. 2010. Characterisation of allergen-specific responses of IL-10-producing regulatory B cells (Br1) in Cow Milk Allergy. *Cell. Immunol.* 264:143–149. doi:10.1016/j.cellimm.2010.05.013.
- Noh, J., G. Noh, S.J. Lee, J.H. Lee, A. Kim, H.S. Kim, and W.S. Choi. 2012. Tolerogenic effects of interferon-gamma with induction of allergen-specific interleukin-10-producing regulatory B cell (Br1) changes in non-IgE-mediated food allergy. *Cell. Immunol.* 273:140–149. doi:10.1016/j.cellimm.2011.12.006.
- Nolte, M.A., R.W. van Olfen, K.P.J.M. van Gisbergen, and R.A.W. van Lier. 2009. Timing and tuning of CD27-CD70 interactions: the impact of signal strength in setting the balance between adaptive responses and immunopathology. *Immunol. Rev.* 229:216–231. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00774.x.
- Nouël, A., P. Pochard, Q. Simon, I. Ségalen, Y. Le Meur, J.O. Pers, and S. Hillion. 2015. B-Cells induce regulatory T cells through TGF- β /IDO production in A CTLA-4 dependent manner. *J. Autoimmun.* 59:53–60. doi:10.1016/j.jaut.2015.02.004.
- Nouël, A., Q. Simon, C. Jamin, J.-O. Pers, and S. Hillion. 2014. Regulatory B cells: an

exciting target for future therapeutics in transplantation. *Front. Immunol.* 5:11. doi:10.3389/fimmu.2014.00011.

Oda, T., S. Imai, S. Chiba, and K. Takada. 2000. Epstein-Barr virus lacking glycoprotein gp85 cannot infect B cells and epithelial cells. *Virology.* 276:52–58. doi:10.1006/viro.2000.0531.

O’Farrell, A.M., Y. Liu, K.W. Moore, and A.L. Mui. 1998. IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17:1006–1018. doi:10.1093/emboj/17.4.1006.

O’Garra, A., and K. Murphy. 1994. Role of cytokines in determining T-lymphocyte function. *Curr. Opin. Immunol.* 6:458–466.

Ohashi, M., A.M. Holthaus, M.A. Calderwood, C.-Y. Lai, B. Krastins, D. Sarracino, and E. Johannsen. 2015. The EBNA3 family of Epstein-Barr virus nuclear proteins associates with the USP46/USP12 deubiquitination complexes to regulate lymphoblastoid cell line growth. *PLoS Pathog.* 11:e1004822. doi:10.1371/journal.ppat.1004822.

Ohbayashi, N., S. Mamishi, K. Ishibashi, Y. Maruta, B. Pourakbari, B. Tamizifar, M. Mohammadpour, M. Fukuda, and N. Parvaneh. 2010. Functional characterization of two RAB27A missense mutations found in Griscelli syndrome type 2. *Pigment Cell Melanoma Res.* 23:365–374. doi:10.1111/j.1755-148X.2010.00705.x.

Ok, C.Y., J. Chen, Z.Y. Xu-Monette, A. Tzankov, G.C. Manyam, L. Li, C. Visco, S. Montes-Moreno, K. Dybkær, A. Chiu, A. Orazi, Y. Zu, G. Bhagat, K.L. Richards, E.D. Hsi, W.W.L. Choi, J.H. van Krieken, J. Huh, X. Zhao, M. Ponzoni, A.J.M. Ferreri, F. Bertoni, J.P. Farnen, M.B. Møller, M.A. Piris, J.N. Winter, L.J. Medeiros, and K.H. Young. 2014. Clinical implications of phosphorylated STAT3 expression in De Novo diffuse large B-cell lymphoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 20:5113–5123. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0683.

Oka, A., S. Ishihara, Y. Mishima, Y. Tada, R. Kusunoki, N. Fukuba, T. Yuki, K. Kawashima, S. Matsumoto, and Y. Kinoshita. 2014. Role of regulatory B cells in chronic intestinal inflammation: association with pathogenesis of Crohn’s disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 20:315–328. doi:10.1097/01.MIB.0000437983.14544.d5.

Olkhanud, P.B., B. Damdinsuren, M. Bodogai, R.E. Gress, R. Sen, K. Wejksza, E. Malchinkhuu, R.P. Wersto, and A. Biragyn. 2011. Tumor-evoked regulatory B cells promote breast cancer metastasis by converting resting CD4⁺ T cells to T-regulatory cells. *Cancer Res.* 71:3505–3515. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-4316.

Ouachée-Chardin, M., C. Elie, G. de Saint Basile, F. Le Deist, N. Mahlaoui, C. Picard, B. Neven, J.-L. Casanova, M. Tardieu, M. Cavazzana-Calvo, S. Blanche, and A. Fischer. 2006. Hematopoietic stem cell transplantation in hemophagocytic lymphohistiocytosis: a single-center report of 48 patients. *Pediatrics*. 117:e743-750. doi:10.1542/peds.2005-1789.

Ouyang, Q., W.M. Wagner, S. Walter, C.A. Müller, A. Wikby, G. Aubert, T. Klatt, S. Stevanovic, T. Dodi, and G. Pawelec. 2003. An age-related increase in the number of CD8+ T cells carrying receptors for an immunodominant Epstein-Barr virus (EBV) epitope is counteracted by a decreased frequency of their antigen-specific responsiveness. *Mech. Ageing Dev.* 124:477–485.

Ouyang, W., O. Beckett, R.A. Flavell, and M.O. Li. 2009. An essential role of the Forkhead-box transcription factor Foxo1 in control of T cell homeostasis and tolerance. *Immunity*. 30:358–371. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.003.

Oyama, T., K. Ichimura, R. Suzuki, J. Suzumiya, K. Ohshima, Y. Yatabe, T. Yokoi, M. Kojima, Y. Kamiya, H. Taji, Y. Kagami, M. Ogura, H. Saito, Y. Morishima, and S. Nakamura. 2003. Senile EBV+ B-cell lymphoproliferative disorders: a clinicopathologic study of 22 patients. *Am. J. Surg. Pathol.* 27:16–26.

Pachlopnik Schmid, J., D. Canioni, D. Moshous, F. Touzot, N. Mahlaoui, F. Hauck, H. Kanegane, E. Lopez-Granados, E. Mejstrikova, I. Pellier, L. Galicier, C. Galambrun, V. Barlogis, P. Bordigoni, A. Fourmaintraux, M. Hamidou, A. Dabadie, F. Le Deist, F. Haerynck, M. Ouachée-Chardin, P. Rohrlich, J.-L. Stephan, C. Lenoir, S. Rigaud, N. Lambert, M. Milili, C. Schiff, H. Chapel, C. Picard, G. de Saint Basile, S. Blanche, A. Fischer, and S. Latour. 2011. Clinical similarities and differences of patients with X-linked lymphoproliferative syndrome type 1 (XLP-1/SAP deficiency) versus type 2 (XLP-2/XIAP deficiency). *Blood*. 117:1522–1529. doi:10.1182/blood-2010-07-298372.

Pacholczyk, R., H. Ignatowicz, P. Kraj, and L. Ignatowicz. 2006. Origin and T cell receptor diversity of Foxp3+CD4+CD25+ T cells. *Immunity*. 25:249–259. doi:10.1016/j.immuni.2006.05.016.

Pagel, J., K. Beutel, K. Lehmborg, F. Koch, A. Maul-Pavicic, A.-K. Rohlf, A. Al-Jefri, R. Beier, L.B. Ousager, K. Ehlert, U. Gross-Wieltsch, N. Jorch, B. Kremens, A. Pekrun, M. Sparber-Sauer, E. Mejstrikova, A. Wawer, S. Ehl, U. zur Stadt, and G. Janka. 2012. Distinct mutations in STXBP2 are associated with variable clinical presentations in patients with familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL5). *Blood*. 119:6016–6024. doi:10.1182/blood-2011-12-398958.

Palendira, U., C. Low, A.I. Bell, C.S. Ma, R.J.M. Abbott, T.G. Phan, D.S. Riminton, S. Choo, J.M. Smart, V. Lougaris, S. Giliani, R.H. Buckley, B. Grimbacher, F. Alvaro, A.D. Klion, K.E. Nichols, S. Adelstein, A.B. Rickinson, and S.G. Tangye. 2012. Expansion of somatically reverted memory CD8+ T cells in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by selective pressure from Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 209:913–924. doi:10.1084/jem.20112391.

Palendira, U., C. Low, A. Chan, A.D. Hislop, E. Ho, T.G. Phan, E. Deenick, M.C. Cook, D.S. Riminton, S. Choo, R. Loh, F. Alvaro, C. Booth, H.B. Gaspar, A. Moretta, R. Khanna, A.B. Rickinson, and S.G. Tangye. 2011. Molecular Pathogenesis of EBV Susceptibility in XLP as Revealed by Analysis of Female Carriers with Heterozygous Expression of SAP. *PLOS Biol.* 9:e1001187. doi:10.1371/journal.pbio.1001187.

Paludan, C., K. Bickham, S. Nikiforow, M.L. Tsang, K. Goodman, W.A. Hanekom, J.-F. Fonteneau, S. Stevanović, and C. Münz. 2002. Epstein-Barr nuclear antigen 1-specific CD4(+) Th1 cells kill Burkitt's lymphoma cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 169:1593–1603.

Panikkar, A., C. Smith, A. Hislop, N. Tellam, V. Dasari, K.A. Hogquist, M. Wykes, D.J. Moss, A. Rickinson, H.H. Balfour, and R. Khanna. 2015. Cytokine-Mediated Loss of Blood Dendritic Cells During Epstein-Barr Virus-Associated Acute Infectious Mononucleosis: Implication for Immune Dysregulation. *J. Infect. Dis.* 212:1957–1961. doi:10.1093/infdis/jiv340.

Pappworth, I.Y., E.C. Wang, and M. Rowe. 2007. The switch from latent to productive infection in Epstein-Barr virus-infected B cells is associated with sensitization to NK cell killing. *J. Virol.* 81:474–482. doi:10.1128/JVI.01777-06.

Paramita, D.K., C. Fatmawati, H. Juwana, F.G. van Schaijk, J. Fachiroh, S.M. Haryana, and J.M. Middeldorp. 2011. Humoral immune responses to Epstein-Barr virus encoded tumor associated proteins and their putative extracellular domains in nasopharyngeal carcinoma patients and regional controls. *J. Med. Virol.* 83:665–678. doi:10.1002/jmv.21960.

Park, G.B., S.R. Bang, H.-K. Lee, D. Kim, S. Kim, J.K. Kim, Y.S. Kim, and D.Y. Hur. 2014. Ligation of CD47 induces G1 arrest in EBV-transformed B cells through ROS generation, p38 MAPK/JNK activation, and Tap73 upregulation. *J. Immunother. Hagerstown Md 1997.* 37:309–320. doi:10.1097/CJI.0000000000000042.

Park, G.B., Y.S. Kim, H.-K. Lee, H. Song, D.-H. Cho, W.J. Lee, and D.Y. Hur. 2010. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis of EBV-transformed B cells by cross-

linking of CD70 is dependent upon generation of reactive oxygen species and activation of p38 MAPK and JNK pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 185:7274–7284. doi:10.4049/jimmunol.1001547.

Park, S., J. Lee, Y.H. Ko, A. Han, H.J. Jun, S.C. Lee, I.G. Hwang, Y.H. Park, J.S. Ahn, C.W. Jung, K. Kim, Y.C. Ahn, W.K. Kang, K. Park, and W.S. Kim. 2007. The impact of Epstein-Barr virus status on clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood.* 110:972–978. doi:10.1182/blood-2007-01-067769.

Parvaneh, N., A.H. Filipovich, and A. Borkhardt. 2013. Primary immunodeficiencies predisposed to Epstein-Barr virus-driven haematological diseases. *Br. J. Haematol.* 162:573–586. doi:10.1111/bjh.12422.

Paschos, K., Q. Bazot, G. Ho, G.A. Parker, J. Lees, G. Barton, and M.J. Allday. 2016. Core binding factor (CBF) is required for Epstein-Barr virus EBNA3 proteins to regulate target gene expression. *Nucleic Acids Res.* doi:10.1093/nar/gkw1167.

Pathmanathan, R., U. Prasad, G. Chandrika, R. Sadler, K. Flynn, and N. Raab-Traub. 1995. Undifferentiated, nonkeratinizing, and squamous cell carcinoma of the nasopharynx. Variants of Epstein-Barr virus-infected neoplasia. *Am. J. Pathol.* 146:1355–1367.

Paulson, E.J., J.D. Fingerroth, J.L. Yates, and S.H. Speck. 2002. Methylation of the EBV Genome and Establishment of Restricted Latency in Low-Passage EBV-Infected 293 Epithelial Cells. *Virology.* 299:109–121. doi:10.1006/viro.2002.1457.

Paydas, S., E. Bağır, G. Seydaoglu, V. Ercolak, and M. Ergin. 2015. Programmed death-1 (PD-1), programmed death-ligand 1 (PD-L1), and EBV-encoded RNA (EBER) expression in Hodgkin lymphoma. *Ann. Hematol.* 94:1545–1552. doi:10.1007/s00277-015-2403-2.

Pedneault, L., N. Lapointe, C. Alfieri, P. Ghadirian, L. Carpentier, J. Samson, and J. Joncas. 1996. Antibody responses to two Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigens (EBNA-1 and EBNA-2) during EBV primary infection in children born to mothers infected with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 23:806–808.

Portis, T., P. Dyck, and R. Longnecker. 2003. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood.* 102:4166–4178. doi:10.1182/blood-2003-04-1018.

Pot, C., L. Apetoh, and V.K. Kuchroo. 2011. Type 1 regulatory T cells (Tr1) in autoimmunity. *Semin. Immunol.* 23:202–208. doi:10.1016/j.smim.2011.07.005.

Precopio, M.L., J.L. Sullivan, C. Willard, M. Somasundaran, and K. Luzuriaga. 2003. Differential kinetics and specificity of EBV-specific CD4+ and CD8+ T cells during primary

infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 170:2590–2598.

Presland, R.B. 2016. Biology of chronic graft-vs-host disease: Immune mechanisms and progress in biomarker discovery. *World J. Transplant.* 6:608–619. doi:10.5500/wjt.v6.i4.608.

Pulendran, B. 2004. Modulating vaccine responses with dendritic cells and Toll-like receptors. *Immunol. Rev.* 199:227–250. doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00144.x.

Punwani, D., B. Pelz, J. Yu, N.C. Arva, K. Schafernak, K. Kondratowicz, M. Makhija, and J.M. Puck. 2015. Coronin-1A: Immune Deficiency in Humans and Mice. *J. Clin. Immunol.* 35:100–107. doi:10.1007/s10875-015-0130-z.

Purtilo, D.T., C.K. Cassel, J.P. Yang, and R. Harper. 1975. X-linked recessive progressive combined variable immunodeficiency (Duncan's disease). *Lancet Lond. Engl.* 1:935–940.

Qiu, J., P. Smith, L. Leahy, and D.A. Thorley-Lawson. 2015. The Epstein-Barr Virus Encoded BART miRNAs Potentiate Tumor Growth In Vivo. *PLoS Pathog.* 11. doi:10.1371/journal.ppat.1004561.

Raab-Traub, N. 2002. Epstein-Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin. Cancer Biol.* 12:431–441.

Rabson, M., L. Gradoville, L. Heston, and G. Miller. 1982. Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J. Virol.* 44:834–844.

Ragoczy, T., L. Heston, and G. Miller. 1998. The Epstein-Barr virus Rta protein activates lytic cycle genes and can disrupt latency in B lymphocytes. *J. Virol.* 72:7978–7984.

Ravell, J., B. Chaigne-Delalande, and M. Lenardo. 2014. XMEN DISEASE: A COMBINED IMMUNE DEFICIENCY WITH MAGNESIUM DEFECT. *Curr. Opin. Pediatr.* 26:713–719. doi:10.1097/MOP.0000000000000156.

Ray, A., and B.N. Dittel. 2017. Mechanisms of Regulatory B cell Function in Autoimmune and Inflammatory Diseases beyond IL-10. *J. Clin. Med.* 6. doi:10.3390/jcm6010012.

Readinger, J.A., K.L. Mueller, A.M. Venegas, R. Horai, and P.L. Schwartzberg. 2009. Tec kinases regulate T-lymphocyte development and function: new insights into the roles of Itk and Rlk/Txk. *Immunol. Rev.* 228:93–114. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00757.x.

Recher, M., K.S. Lang, L. Hunziker, S. Freigang, B. Eschli, N.L. Harris, A. Navarini, B.M. Senn, K. Fink, M. Lötscher, L. Hangartner, R. Zellweger, M. Hersberger, A. Theodorides, H. Hangartner, and R.M. Zinkernagel. 2004. Deliberate removal of T cell help improves virus-neutralizing antibody production. *Nat. Immunol.* 5:934–942. doi:10.1038/ni1102.

Rechsteiner, M.P., C. Berger, L. Zauner, J.A. Sigrist, M. Weber, R. Longnecker, M. Bernasconi, and D. Nadal. 2008. Latent membrane protein 2B regulates susceptibility to

- induction of lytic Epstein-Barr virus infection. *J. Virol.* 82:1739–1747. doi:10.1128/JVI.01723-07.
- Reisman, D., J. Yates, and B. Sugden. 1985. A putative origin of replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus is composed of two cis-acting components. *Mol. Cell. Biol.* 5:1822–1832.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu. Rev. Immunol.* 29:163–183. doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101345.
- Revoltella, R.P., E. Vigneti, A. Fruscalzo, M. Park, G. Ragona, G. Rocchi, and E. Calef. 1989. Epstein-Barr virus DNA sequences in precursor monocyte-macrophage cell lines established from the bone marrow of children with maturation defects of haematopoiesis. *J. Gen. Virol.* 70 (Pt 5):1203–1215. doi:10.1099/0022-1317-70-5-1203.
- Rickinson, A.B., H.M. Long, U. Palendira, C. Münz, and A.D. Hislop. 2014. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol.* 35:159–169. doi:10.1016/j.it.2014.01.003.
- Rigaud, S., M.-C. Fondanèche, N. Lambert, B. Pasquier, V. Mateo, P. Soulas, L. Galicier, F. Le Deist, F. Rieux-Laucat, P. Revy, A. Fischer, G. de Saint Basile, and S. Latour. 2006. XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome. *Nature.* 444:110–114. doi:10.1038/nature05257.
- Rincón-Arévalo, H., C.C. Sanchez-Parra, D. Castaño, L. Yassin, and G. Vásquez. 2016. Regulatory B Cells and Mechanisms. *Int. Rev. Immunol.* 35:156–176. doi:10.3109/08830185.2015.1015719.
- Robertson, E.S. 2010. Epstein-Barr Virus: Latency and Transformation. Horizon Scientific Press. 210 pp.
- Robertson, E.S., B. Tomkinson, and E. Kieff. 1994. An Epstein-Barr virus with a 58-kilobase-pair deletion that includes BARF0 transforms B lymphocytes in vitro. *J. Virol.* 68:1449–1458.
- Rode, H.J., J.J. Bugert, M. Handermann, P. Schnitzler, R. Kehm, W. Janssen, H. Delius, and G. Darai. 1994. Molecular characterization and determination of the coding capacity of the genome of equine herpesvirus type 2 between the genome coordinates 0.235 and 0.258 (the EcoRI DNA fragment N; 4.2 kbp). *Virus Genes.* 9:61–75.
- Roep, B.O. 1996. T-cell responses to autoantigens in IDDM. The search for the Holy Grail. *Diabetes.* 45:1147–1156.
- Roschewski, M. 2012. EBV-associated lymphomas in adults. *Best Pract. Res. Clin.*

- Haematol.* 25:75–89. doi:10.1016/j.beha.2012.01.005.
- Rosenberg, W. 1999. Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut.* 44:759–764.
- Rosser, E.C., and C. Mauri. 2015. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity.* 42:607–612. doi:10.1016/j.immuni.2015.04.005.
- Rosser, E.C., K. Oleinika, S. Tonon, R. Doyle, A. Bosma, N.A. Carter, K.A. Harris, S.A. Jones, N. Klein, and C. Mauri. 2014. Regulatory B cells are induced by gut microbiota-driven interleukin-1 β and interleukin-6 production. *Nat. Med.* 20:1334–1339. doi:10.1038/nm.3680.
- Rota, S., I. Fidan, T. Muderris, E. Yesilyurt, and Z. Lale. 2010. Cytokine levels in patients with Epstein-Barr virus associated laryngeal carcinoma. *J. Laryngol. Otol.* 124:990–994. doi:10.1017/S0022215110001416.
- Rovedo, M., and R. Longnecker. 2007. Epstein-barr virus latent membrane protein 2B (LMP2B) modulates LMP2A activity. *J. Virol.* 81:84–94. doi:10.1128/JVI.01302-06.
- Rowe, M., S. Raithatha, and C. Shannon-Lowe. 2014. Counteracting Effects of Cellular Notch and Epstein-Barr Virus EBNA2: Implications for Stromal Effects on Virus-Host Interactions. *J. Virol.* 88:12065. doi:10.1128/JVI.01431-14.
- Rudd, E., K. Göransdotter Ericson, C. Zheng, Z. Uysal, A. Ozkan, A. Gürgey, B. Fadeel, M. Nordenskjöld, and J.-I. Henter. 2006. Spectrum and clinical implications of syntaxin 11 gene mutations in familial haemophagocytic lymphohistiocytosis: association with disease-free remissions and haematopoietic malignancies. *J. Med. Genet.* 43:e14. doi:10.1136/jmg.2005.035253.
- Rudensky, A.Y. 2011. Regulatory T cells and Foxp3. *Immunol. Rev.* 241:260–268. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01018.x.
- Sadler, R.H., and N. Raab-Traub. 1995. Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J. Virol.* 69:1132–1141.
- Saha, A., and E.S. Robertson. 2011. Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas: pathogenesis and clinical outcomes. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 17:3056–3063. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2578.
- Saito, R., H. Abe, A. Kunita, H. Yamashita, Y. Seto, and M. Fukayama. 2017. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1(+) immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. *Mod. Pathol. Off. J. U. S. Can. Acad. Pathol. Inc.* 30:427–439. doi:10.1038/modpathol.2016.202.
- Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, and M. Toda. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25).

Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 155:1151–1164.

Sakamoto, K., T. Sekizuka, T. Uehara, T. Hishima, S. Mine, H. Fukumoto, Y. Sato, H. Hasegawa, M. Kuroda, and H. Katano. 2017. Next-generation sequencing of miRNAs in clinical samples of Epstein-Barr virus-associated B-cell lymphomas. *Cancer Med.* 6:605–618. doi:10.1002/cam4.1006.

Salamon, D., M. Adori, D. Ujvari, L. Wu, L.L. Kis, H.S. Madapura, N. Nagy, G. Klein, and E. Klein. 2012. Latency Type-Dependent Modulation of Epstein-Barr Virus-Encoded Latent Membrane Protein 1 Expression by Type I Interferons in B Cells. *J. Virol.* 86:4701–4707. doi:10.1128/JVI.06829-11.

Salzer, E., S. Daschkey, S. Choo, M. Gombert, E. Santos-Valente, S. Ginzel, M. Schwendinger, O.A. Haas, G. Fritsch, W.F. Pickl, E. Förster-Waldl, A. Borkhardt, K. Boztug, K. Bienemann, and M.G. Seidel. 2013. Combined immunodeficiency with life-threatening EBV-associated lymphoproliferative disorder in patients lacking functional CD27. *Haematologica.* 98:473–478. doi:10.3324/haematol.2012.068791.

Samanta, M., and K. Takada. 2010. Modulation of innate immunity system by Epstein-Barr virus-encoded non-coding RNA and oncogenesis. *Cancer Sci.* 101:29–35. doi:10.1111/j.1349-7006.2009.01377.x.

Sánchez-Martínez, D., G. Azaceta, A. Muntasell, N. Aguiló, D. Núñez, E.M. Gálvez, J. Naval, A. Anel, L. Palomera, C. Vilches, I. Marzo, M. Villalba, and J. Pardo. 2015. Human NK cells activated by EBV(+) lymphoblastoid cells overcome anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in haematological cancer cells. *Oncoimmunology.* 4:e991613. doi:10.4161/2162402X.2014.991613.

Santegoets, S.J., A.W. Turksma, D.J. Powell Jr., E. Hooijberg, and T.D. de Gruijl. 2013. IL-21 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology.* 2. doi:10.4161/onci.24522.

Santibañez, J.F. 2006. JNK mediates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. *FEBS Lett.* 580:5385–5391. doi:10.1016/j.febslet.2006.09.003.

Sarris, A.H., K.O. Kliche, P. Pethambaram, A. Preti, S. Tucker, C. Jackow, O. Messina, W. Pugh, F.B. Hagemester, P. McLaughlin, M.A. Rodriguez, J. Romaguera, H. Fritsche, T. Witzig, M. Duvic, M. Andreeff, and F. Cabanillas. 1999. Interleukin-10 levels are often elevated in serum of adults with Hodgkin's disease and are associated with inferior failure-free survival. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 10:433–440.

Sarvaria, A., R. Basar, R.S. Mehta, H. Shaim, M. Muftuoglu, A. Khoder, T. Sekine, E. Gokdemir, K. Kondo, D. Marin, M. Daher, A.M. Alousi, A. Alsuliman, E. Liu, B. Oran, A. Olson, R.B. Jones, U. Popat, C. Hosing, R. Champlin, E.J. Shpall, and K. Rezvani. 2016. IL-10+ regulatory B cells are enriched in cord blood and may protect against cGVHD after cord blood transplantation. *Blood*. 128:1346–1361. doi:10.1182/blood-2016-01-695122.

Sarvaria, A., J.A. Madrigal, and A. Saudemont. 2017. B cell regulation in cancer and anti-tumor immunity. *Cell. Mol. Immunol.* 14:662–674. doi:10.1038/cmi.2017.35.

Sato, E., S. Ohga, H. Kuroda, F. Yoshida, M. Nishimura, M. Nagasawa, M. Inoue, and K. Kawa. 2008. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disease in Japan. *Am. J. Hematol.* 83:721–727. doi:10.1002/ajh.21247.

Savard, M., C. Bélanger, M. Tardif, P. Gourde, L. Flamand, and J. Gosselin. 2000. Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74:2612–2619.

Sawant, D.V., K. Hamilton, and D.A.A. Vignali. 2015. Interleukin-35: Expanding Its Job Profile. *J. Interferon Cytokine Res.* 35:499–512. doi:10.1089/jir.2015.0015.

Sayi, A., E. Kohler, I.M. Toller, R.A. Flavell, W. Müller, A. Roers, and A. Müller. 2011. TLR-2-activated B cells suppress Helicobacter-induced preneoplastic gastric immunopathology by inducing T regulatory-1 cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 186:878–890. doi:10.4049/jimmunol.1002269.

Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M.G. Roncarolo, H. Oettgen, J.E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* 395:462–469. doi:10.1038/26683.

Saze, Z., P.J. Schuler, C.-S. Hong, D. Cheng, E.K. Jackson, and T.L. Whiteside. 2013. Adenosine production by human B cells and B cell-mediated suppression of activated T cells. *Blood.* 122:9–18. doi:10.1182/blood-2013-02-482406.

Schmitz, R., M. Ceribelli, S. Pittaluga, G. Wright, and L.M. Staudt. 2014. Oncogenic Mechanisms in Burkitt Lymphoma. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 4:a014282. doi:10.1101/cshperspect.a014282.

Schneider, E.M., I. Lorenz, M. Müller-Rosenberger, G. Steinbach, M. Kron, and G.E. Janka-Schaub. 2002. Hemophagocytic lymphohistiocytosis is associated with deficiencies of cellular cytotoxicity but normal expression of transcripts relevant to killer-cell-induced apoptosis. *Blood.* 100:2891–2898. doi:10.1182/blood-2001-12-0260.

- Schubert, R.D., Y. Hu, G. Kumar, S. Szeto, P. Abraham, J. Winderl, J.M. Guthridge, G. Pardo, J. Dunn, L. Steinman, and R.C. Axtell. 2015. IFN- β treatment requires B cells for efficacy in neuroautoimmunity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 194:2110–2116. doi:10.4049/jimmunol.1402029.
- Schwartz, M., Y. Zhang, and J.D. Rosenblatt. 2016. B cell regulation of the anti-tumor response and role in carcinogenesis. *J. Immunother. Cancer.* 4:40. doi:10.1186/s40425-016-0145-x.
- Seddiki, N., B. Santner-Nanan, J. Martinson, J. Zaunders, S. Sasson, A. Landay, M. Solomon, W. Selby, S.I. Alexander, R. Nanan, A. Kelleher, and B. Fazekas de St Groth. 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.* 203:1693–1700. doi:10.1084/jem.20060468.
- Seigneurin, J.-M. 1997. Infection à virus d'Epstein-Barr chez l'immunodéprimé : physiopathologie et méthodes d'analyse. *Virologie.* 1:391–402.
- Serwas, N.K., D. Cagdas, S.A. Ban, K. Bienemann, E. Salzer, İ. Tezcan, A. Borkhardt, O. Sanal, and K. Boztug. 2014. Identification of ITK deficiency as a novel genetic cause of idiopathic CD4+ T-cell lymphopenia. *Blood.* 124:655–657. doi:10.1182/blood-2014-03-564930.
- Shabani, M., K.E. Nichols, and N. Rezaei. 2016. Primary immunodeficiencies associated with EBV-Induced lymphoproliferative disorders. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 108:109–127. doi:10.1016/j.critrevonc.2016.10.014.
- Shaknovich, R., K. Basso, G. Bhagat, M. Mansukhani, G. Hatzivassiliou, V.V. Murty, M. Buettner, G. Niedobitek, B. Alobeid, and G. Cattoretti. 2006. Identification of rare Epstein-Barr virus infected memory B cells and plasma cells in non-monomorphic post-transplant lymphoproliferative disorders and the signature of viral signaling. *Haematologica.* 91:1313–1320.
- Shanmugaratnam, K., and L.H. Sobin. 1993. The World Health Organization histological classification of tumours of the upper respiratory tract and ear. A commentary on the second edition. *Cancer.* 71:2689–2697.
- Shannon-Lowe, C., A.B. Rickinson, and A.I. Bell. 2017. Epstein–Barr virus-associated lymphomas. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372. doi:10.1098/rstb.2016.0271.
- Shannon-Lowe, C., and M. Rowe. 2011. Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog.* 7:e1001338. doi:10.1371/journal.ppat.1001338.

- Shao, Y., C.M. Lo, C.C. Ling, X.B. Liu, K.T.-P. Ng, A.C.Y. Chu, Y.Y. Ma, C.X. Li, S.T. Fan, and K. Man. 2014. Regulatory B cells accelerate hepatocellular carcinoma progression via CD40/CD154 signaling pathway. *Cancer Lett.* 355:264–272. doi:10.1016/j.canlet.2014.09.026.
- Sharma, M.D., B. Baban, P. Chandler, D.-Y. Hou, N. Singh, H. Yagita, M. Azuma, B.R. Blazar, A.L. Mellor, and D.H. Munn. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 117:2570–2582. doi:10.1172/JCI31911.
- Shen, P., T. Roch, V. Lampropoulou, R.A. O'Connor, U. Stervbo, E. Hilgenberg, S. Ries, V.D. Dang, Y. Jaimes, C. Daridon, R. Li, L. Jouneau, P. Boudinot, S. Wilantri, I. Sakwa, Y. Miyazaki, M.D. Leech, R.C. McPherson, S. Wirtz, M. Neurath, K. Hoehlig, E. Meinl, A. Grützkau, J.R. Grün, K. Horn, A.A. Köhl, T. Dörner, A. Bar-Or, S.H.E. Kaufmann, S.M. Anderton, and S. Fillatreau. 2014. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 507:366–370. doi:10.1038/nature12979.
- Sheng, J., W. Chen, and H.-J. Zhu. 2015. The immune suppressive function of transforming growth factor- β (TGF- β) in human diseases. *Growth Factors Chur Switz.* 33:92–101. doi:10.3109/08977194.2015.1010645.
- Shi, M. 2016. 6P Expression of PD-L1 in lung cancer cells regulates Treg cell differentiation. *J. Thorac. Oncol.* 11:S59. doi:10.1016/S1556-0864(16)30121-6.
- Shibata, D., M. Tokunaga, Y. Uemura, E. Sato, S. Tanaka, and L.M. Weiss. 1991. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am. J. Pathol.* 139:469–474.
- Shiow, L.R., D.W. Roadcap, K. Paris, S.R. Watson, I.L. Grigorova, T. Lebet, J. An, Y. Xu, C.N. Jenne, N. Föger, R.U. Sorensen, C.C. Goodnow, J.E. Bear, J.M. Puck, and J.G. Cyster. 2008. The actin regulator coronin 1A is mutant in a thymic egress-deficient mouse strain and in a patient with severe combined immunodeficiency. *Nat. Immunol.* 9:1307–1315. doi:10.1038/ni.1662.
- Sides, M.D., R.C. Klingsberg, B. Shan, K.A. Gordon, H.T. Nguyen, Z. Lin, T. Takahashi, E.K. Flemington, and J.A. Lasky. 2011. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and transforming growth factor- β 1 synergistically induce epithelial-mesenchymal transition in lung epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 44:852–862. doi:10.1165/rcmb.2009-0232OC.
- Siegmund, K., V. Klepsch, N. Hermann-Kleiter, and G. Baier. 2016. Proof of Principle for a

T Lymphocyte Intrinsic Function of Coronin 1A. *J. Biol. Chem.* 291:22086–22092. doi:10.1074/jbc.M116.748012.

Siewe, B., J.T. Stapleton, J. Martinson, A. Keshavarzian, N. Kazmi, P.M. Demarais, A.L. French, and A. Landay. 2013. Regulatory B cell frequency correlates with markers of HIV disease progression and attenuates anti-HIV CD8⁺ T cell function in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 93:811–818. doi:10.1189/jlb.0912436.

Siewe, B., J. Wallace, S. Rygielski, J.T. Stapleton, J. Martin, S.G. Deeks, and A. Landay. 2014. Regulatory B cells inhibit cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity and elimination of infected CD4 T cells after in vitro reactivation of HIV latent reservoirs. *PloS One.* 9:e92934. doi:10.1371/journal.pone.0092934.

Silva, H.M., M.C.S. Takenaka, P.M.M. Moraes-Vieira, S.M. Monteiro, M.O. Hernandez, W. Chaara, A. Six, F. Agena, P. Sesterheim, F.M. Barbé-Tuana, D. Saitovitch, F. Lemos, J. Kalil, and V. Coelho. 2012. Preserving the B-cell compartment favors operational tolerance in human renal transplantation. *Mol. Med. Camb. Mass.* 18:733–743. doi:10.2119/molmed.2011.00281.

Sim, G.C., C. Liu, E. Wang, H. Liu, C. Creasy, Z. Dai, W.W. Overwijk, J. Roszik, F. Marincola, P. Hwu, E. Grimm, and L. Radvanyi. 2016. IL2 Variant Circumvents ICOS⁺ Regulatory T-cell Expansion and Promotes NK Cell Activation. *Cancer Immunol. Res.* 4:983–994. doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0195.

Sixbey, J.W., J.G. Nedrud, N. Raab-Traub, R.A. Hanes, and J.S. Pagano. 1984. Epstein-Barr virus replication in oropharyngeal epithelial cells. *N. Engl. J. Med.* 310:1225–1230. doi:10.1056/NEJM198405103101905.

Sixbey, J.W., and Q.Y. Yao. 1992. Immunoglobulin A-induced shift of Epstein-Barr virus tissue tropism. *Science.* 255:1578–1580.

Smith, H., Y. Sakamoto, K. Kasai, and K.S. Tung. 1991. Effector and regulatory cells in autoimmune oophoritis elicited by neonatal thymectomy. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 147:2928–2933.

Smith, P.R., O. de Jesus, D. Turner, M. Hollyoake, C.E. Karstegl, B.E. Griffin, L. Karran, Y. Wang, S.D. Hayward, and P.J. Farrell. 2000. Structure and coding content of CST (BART) family RNAs of Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 74:3082–3092.

Sokal, E.M., K. Hoppenbrouwers, C. Vandermeulen, M. Moutschen, P. Léonard, A. Moreels, M. Haumont, A. Bollen, F. Smets, and M. Denis. 2007. Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to

evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 196:1749–1753. doi:10.1086/523813.

Song, H., H. Park, J. Kim, G. Park, Y.-S. Kim, S.M. Kim, D. Kim, S.K. Seo, H.-K. Lee, D. Cho, and D. Hur. 2011. IDO metabolite produced by EBV-transformed B cells inhibits surface expression of NKG2D in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway. *Immunol. Lett.* 136:187–193. doi:10.1016/j.imlet.2011.01.009.

Soni, V., E. Cahir-McFarland, and E. Kieff. 2007. LMP1 TRAFFicking activates growth and survival pathways. *Adv. Exp. Med. Biol.* 597:173–187. doi:10.1007/978-0-387-70630-6_14.

Sorem, J., T.S. Jardetzky, and R. Longnecker. 2009. Cleavage and secretion of Epstein-Barr virus glycoprotein 42 promote membrane fusion with B lymphocytes. *J. Virol.* 83:6664–6672. doi:10.1128/JVI.00195-09.

Soyer, O.U., M. Akdis, J. Ring, H. Behrendt, R. Cramer, R. Lauener, and C.A. Akdis. 2013. Mechanisms of peripheral tolerance to allergens. *Allergy.* 68:161–170. doi:10.1111/all.12085.

Speckmann, C., K. Lehmborg, M.H. Albert, R.B. Damgaard, M. Fritsch, M. Gyrd-Hansen, A. Rensing-Ehl, T. Vraetz, B. Grimbacher, U. Salzer, I. Fuchs, H. Ufheil, B.H. Belohradsky, A. Hassan, C.M. Cale, M. Elawad, B. Strahm, S. Schibli, M. Lauten, M. Kohl, J.J. Meerpohl, B. Rodeck, R. Kolb, W. Eberl, J. Soerensen, H. von Bernuth, M. Lorenz, K. Schwarz, U. zur Stadt, and S. Ehl. 2013. X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) deficiency: The spectrum of presenting manifestations beyond hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Clin. Immunol.* 149:133–141. doi:10.1016/j.clim.2013.07.004.

Stanley, J.R. 1995. Autoantibodies against adhesion molecules and structures in blistering skin diseases. *J. Exp. Med.* 181:1–4.

Steidl, C., T. Lee, S.P. Shah, P. Farinha, G. Han, T. Nayar, A. Delaney, S.J. Jones, J. Iqbal, D.D. Weisenburger, M.A. Bast, A. Rosenwald, H.-K. Muller-Hermelink, L.M. Rimsza, E. Campo, J. Delabie, R.M. Braziel, J.R. Cook, R.R. Tubbs, E.S. Jaffe, G. Lenz, J.M. Connors, L.M. Staudt, W.C. Chan, and R.D. Gascoyne. 2010. Tumor-associated macrophages and survival in classic Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 362:875–885. doi:10.1056/NEJMoa0905680.

Steigerwald-Mullen, P., M.G. Kurilla, and T.J. Braciale. 2000. Type 2 cytokines predominate in the human CD4(+) T-lymphocyte response to Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J. Virol.* 74:6748–6759.

Stepensky, P., M. Weintraub, A. Yanir, S. Revel-Vilk, F. Krux, K. Huck, R.M. Linka, A. Shaag, O. Elpeleg, A. Borkhardt, and I.B. Resnick. 2011. IL-2-inducible T-cell kinase

deficiency: clinical presentation and therapeutic approach. *Haematologica*. 96:472–476. doi:10.3324/haematol.2010.033910.

Stepp, S.E., R. Dufourcq-Lagelouse, F. Le Deist, S. Bhawan, S. Certain, P.A. Mathew, J.I. Henter, M. Bennett, A. Fischer, G. de Saint Basile, and V. Kumar. 1999. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*. 286:1957–1959.

Steven, N.M., N.E. Annels, A. Kumar, A.M. Leese, M.G. Kurilla, and A.B. Rickinson. 1997. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J. Exp. Med.* 185:1605–1617.

Steven, N.M., A.M. Leese, N.E. Annels, S.P. Lee, and A.B. Rickinson. 1996. Epitope focusing in the primary cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus and its relationship to T cell memory. *J. Exp. Med.* 184:1801–1813.

Strong, M.J., G. Xu, J. Coco, C. Baribault, D.S. Vinay, M.R. Lacey, A.L. Strong, T.A. Lehman, M.B. Seddon, Z. Lin, M. Concha, M. Baddoo, M. Ferris, K.F. Swan, D.E. Sullivan, M.E. Burow, C.M. Taylor, and E.K. Flemington. 2013. Differences in gastric carcinoma microenvironment stratify according to EBV infection intensity: implications for possible immune adjuvant therapy. *PLoS Pathog.* 9:e1003341. doi:10.1371/journal.ppat.1003341.

Strowig, T., F. Brilot, F. Arrey, G. Bougras, D. Thomas, W.A. Muller, and C. Münz. 2008. Tonsillar NK cells restrict B cell transformation by the Epstein-Barr virus via IFN-gamma. *PLoS Pathog.* 4:e27. doi:10.1371/journal.ppat.0040027.

Su, S., Z. Zou, F. Chen, N. Ding, J. Du, J. Shao, L. Li, Y. Fu, B. Hu, Y. Yang, H. Sha, F. Meng, J. Wei, X. Huang, and B. Liu. 2017. CRISPR-Cas9-mediated disruption of PD-1 on human T cells for adoptive cellular therapies of EBV positive gastric cancer. *Oncoimmunology*. 6:e1249558. doi:10.1080/2162402X.2016.1249558.

Sugaya, N., H. Kimura, S. Hara, Y. Hoshino, S. Kojima, T. Morishima, T. Tsurumi, and K. Kuzushima. 2004. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ T cells in patients with chronic active EBV infection. *J. Infect. Dis.* 190:985–988. doi:10.1086/423285.

Sugimoto, A., T. Kanda, Y. Yamashita, T. Murata, S. Saito, D. Kawashima, H. Isomura, Y. Nishiyama, and T. Tsurumi. 2011. Spatiotemporally Different DNA Repair Systems Participate in Epstein-Barr Virus Genome Maturation[▽]. *J. Virol.* 85:6127–6135. doi:10.1128/JVI.00258-11.

Sullivan, J.A., E.H. Kim, E.H. Plisch, and M. Suresh. 2012. FOXO3 Regulates the CD8 T Cell Response to a Chronic Viral Infection. *J. Virol.* 86:9025–9034. doi:10.1128/JVI.00942-12.

- Sun, J.-B., C.-F. Flach, C. Czerkinsky, and J. Holmgren. 2008. B lymphocytes promote expansion of regulatory T cells in oral tolerance: powerful induction by antigen coupled to cholera toxin B subunit. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 181:8278–8287.
- Suri-Payer, E., A.Z. Amar, A.M. Thornton, and E.M. Shevach. 1998. CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 160:1212–1218.
- Sutkowski, N., B. Conrad, D.A. Thorley-Lawson, and B.T. Huber. 2001. Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity*. 15:579–589.
- Tabanelli, V., V. Santiago-Pacheco, M. Corbellino, A. Calleri, C. Agostinelli, C. Parravicini, and S.A. Pileri. 2017. Cytotoxic Epstein-Barr virus-positive large B cell lymphoma: a regulatory B cell-derived neoplasia? *Histopathology*. 70:650–656. doi:10.1111/his.13109.
- Tabiasco, J., A. Vercellone, F. Meggetto, D. Hudrisier, P. Brousset, and J.-J. Fournié. 2003. Acquisition of viral receptor by NK cells through immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 170:5993–5998.
- Tadmor, T., Y. Zhang, H.-M. Cho, E.R. Podack, and J.D. Rosenblatt. 2011. The absence of B lymphocytes reduces the number and function of T-regulatory cells and enhances the anti-tumor response in a murine tumor model. *Cancer Immunol. Immunother. CII*. 60:609–619. doi:10.1007/s00262-011-0972-z.
- Taga, H., K. Taga, F. Wang, J. Chretien, and G. Tosato. 1995. Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J. Infect. Dis*. 171:1347–1350.
- Tagawa, T., M. Albanese, M. Bouvet, A. Moosmann, J. Mautner, V. Heissmeyer, C. Zielinski, D. Lutter, J. Hoser, M. Hastreiter, M. Hayes, B. Sugden, and W. Hammerschmidt. 2016. Epstein-Barr viral miRNAs inhibit antiviral CD4+ T cell responses targeting IL-12 and peptide processing. *J. Exp. Med.* jem.20160248. doi:10.1084/jem.20160248.
- Tagliavini, E., G. Rossi, R. Valli, M. Zanelli, A. Cadioli, M.C. Mengoli, A. Bisagni, A. Cavazza, and G. Gardini. 2013. Lymphomatoid granulomatosis: a practical review for pathologists dealing with this rare pulmonary lymphoproliferative process. *Pathologica*. 105:111–116.
- Takada, K. 2000. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol. Pathol. MP*. 53:255–261.
- Talley, N.J., M.T. Abreu, J.-P. Achkar, C.N. Bernstein, M.C. Dubinsky, S.B. Hanauer, S.V. Kane, W.J. Sandborn, T.A. Ullman, P. Moayyedi, and American College of Gastroenterology IBD Task Force. 2011. An evidence-based systematic review on medical therapies for

inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.* 106 Suppl 1:S2–25; quiz S26. doi:10.1038/ajg.2011.58.

Tamaru, Y., T. Miyawaki, K. Iwai, T. Tsuji, R. Nibu, A. Yachie, S. Koizumi, and N. Taniguchi. 1993. Absence of bcl-2 expression by activated CD45RO+ T lymphocytes in acute infectious mononucleosis supporting their susceptibility to programmed cell death. *Blood.* 82:521–527.

Tangye, S.G., Y.J. Liu, G. Aversa, J.H. Phillips, and J.E. de Vries. 1998. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J. Exp. Med.* 188:1691–1703.

Tangye, S.G., U. Palendira, and E.S.J. Edwards. 2017. Human immunity against EBV-lessons from the clinic. *J. Exp. Med.* 214:269–283. doi:10.1084/jem.20161846.

Tangye, S.G., and D.M. Tarlinton. 2009. Memory B cells: effectors of long-lived immune responses. *Eur. J. Immunol.* 39:2065–2075. doi:10.1002/eji.200939531.

Tanner, J., J. Weis, D. Fearon, Y. Whang, and E. Kieff. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell.* 50:203–213.

Tao, Q., K.D. Robertson, A. Manns, A. Hildesheim, and R.F. Ambinder. 1998. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood.* 91:1373–1381.

Tashiro, H., and M.K. Brenner. 2017. Immunotherapy against cancer-related viruses. *Cell Res.* 27:59–73. doi:10.1038/cr.2016.153.

Taylor, G.S., H.M. Long, J.M. Brooks, A.B. Rickinson, and A.D. Hislop. 2015. The immunology of Epstein-Barr virus-induced disease. *Annu. Rev. Immunol.* 33:787–821. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112326.

Tchernonog, E., P. Faurie, P. Coppo, H. Monjanel, A. Bonnet, M. Algarte Génin, M. Mercier, J. Dupuis, F. Bijou, C. Herbaux, A. Delmer, B. Fabiani, C. Besson, S. Le Gouill, E. Gyan, C. Laurent, H. Ghesquieres, and G. Cartron. 2016. Clinical Characteristics and Prognostic Factors of Plasmablastic Lymphoma Patients: Analysis of 135 Patients from the Lysa Group. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* doi:10.1093/annonc/mdw684.

Terness, P., T.M. Bauer, L. Röse, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, and G. Opelz. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* 196:447–457.

Thomas, D.A., S. Faderl, S. O'Brien, C. Bueso-Ramos, J. Cortes, G. Garcia-Manero, F.J. Giles, S. Verstovsek, W.G. Wierda, S.A. Pierce, J. Shan, M. Brandt, F.B. Hagemeister, M.J. Keating, F. Cabanillas, and H. Kantarjian. 2006. Chemoimmunotherapy with hyper-CVAD plus rituximab for the treatment of adult Burkitt and Burkitt-type lymphoma or acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 106:1569–1580. doi:10.1002/cncr.21776.

Thompson, W.S., M.L. Pekalski, H.Z. Simons, D.J. Smyth, X. Castro-Dopico, H. Guo, C. Guy, D.B. Dunger, S. Arif, M. Peakman, C. Wallace, L.S. Wicker, J.A. Todd, and R.C. Ferreira. 2014. Multi-parametric flow cytometric and genetic investigation of the peripheral B cell compartment in human type 1 diabetes. *Clin. Exp. Immunol.* 177:571–585. doi:10.1111/cei.12362.

Thorley-Lawson, D.A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 1:75–82. doi:10.1038/35095584.

Thorley-Lawson, D.A. 2015. EBV Persistence--Introducing the Virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 390:151–209. doi:10.1007/978-3-319-22822-8_8.

Thorley-Lawson, D.A., K.A. Duca, and M. Shapiro. 2008. Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection - for real and in virtual reality. *Trends Immunol.* 29:195–201. doi:10.1016/j.it.2008.01.006.

Thorley-Lawson, D.A., and A. Gross. 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 350:1328–1337. doi:10.1056/NEJMra032015.

Thorley-Lawson, D.A., and C.A. Poodry. 1982. Identification and isolation of the main component (gp350-gp220) of Epstein-Barr virus responsible for generating neutralizing antibodies in vivo. *J. Virol.* 43:730–736.

Thornton, A.M., E.E. Donovan, C.A. Piccirillo, and E.M. Shevach. 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4+CD25+ T cell suppressor function. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 172:6519–6523.

Tian, J., D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott, and D.L. Kaufman. 2001. Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 167:1081–1089.

Toben, H.R., and R.G. Smith. 1977. T lymphocytes bearing complement receptors in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin. Exp. Immunol.* 27:292–302.

Toczyski, D.P., A.G. Matera, D.C. Ward, and J.A. Steitz. 1994. The Epstein-Barr virus (EBV) small RNA EBER1 binds and relocalizes ribosomal protein L22 in EBV-infected human B

lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:3463–3467.

Tomkinson, B., E. Robertson, and E. Kieff. 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J. Virol.* 67:2014–2025.

Tremat, P., J. Tabiasco, P. Andre, N. Faumont, F. Meggetto, G. Delsol, R.D. Gascoyne, J.-J. Fournie, E. Vivier, and P. Brousset. 2002. Evidence for early infection of nonneoplastic natural killer cells by Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 76:11139–11142.

Trentin, L., R. Zambello, R. Sancetta, M. Facco, A. Cerutti, A. Perin, M. Siviero, U. Basso, M. Bortolin, F. Adami, C. Agostini, and G. Semenzato. 1997. B lymphocytes from patients with chronic lymphoproliferative disorders are equipped with different costimulatory molecules. *Cancer Res.* 57:4940–4947.

Tse, E., and Y.-L. Kwong. 2015. Epstein Barr virus-associated lymphoproliferative diseases: the virus as a therapeutic target. *Exp. Mol. Med.* 47:e136. doi:10.1038/emm.2014.102.

Tseng, S.Y., M. Otsuji, K. Gorski, X. Huang, J.E. Slansky, S.I. Pai, A. Shalabi, T. Shin, D.M. Pardoll, and H. Tsuchiya. 2001. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.* 193:839–846.

Tsoukas, C.D., and J.D. Lambris. 1988. Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 18:1299–1302. doi:10.1002/eji.1830180823.

Uchida, J., T. Yasui, Y. Takaoka-Shichijo, M. Muraoka, W. Kulwichit, N. Raab-Traub, and H. Kikutani. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science.* 286:300–303.

Valentine, R., C.W. Dawson, C. Hu, K.M. Shah, T.J. Owen, K.L. Date, S.P. Maia, J. Shao, J.R. Arrand, L.S. Young, and J.D. O’Neil. 2010. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 inhibits the canonical NF-kappaB pathway in carcinoma cells by inhibiting IKK phosphorylation. *Mol. Cancer.* 9:1. doi:10.1186/1476-4598-9-1.

Valera, A., O. Balagué, L. Colomo, A. Martínez, J. Delabie, L. Taddesse-Heath, E.S. Jaffe, and E. Campo. 2010. IG/MYC rearrangements are the main cytogenetic alteration in plasmablastic lymphomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 34:1686–1694. doi:10.1097/PAS.0b013e3181f3e29f.

van de Veen, W., B. Stanic, G. Yaman, M. Wawrzyniak, S. Söllner, D.G. Akdis, B. Rückert, C.A. Akdis, and M. Akdis. 2013. IgG4 production is confined to human IL-10-producing regulatory B cells that suppress antigen-specific immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.*

131:1204–1212. doi:10.1016/j.jaci.2013.01.014.

van der Vlugt, L.E., E. Mlejnek, A. Ozir-Fazalalikhani, M. Janssen Bonas, T.R. Dijkman, L.A. Labuda, R. Schot, B. Guigas, G.M. Möller, P.S. Hiemstra, M. Yazdanbakhsh, and H.H. Smits. 2014a. CD24(hi)CD27(+) B cells from patients with allergic asthma have impaired regulatory activity in response to lipopolysaccharide. *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 44:517–528. doi:10.1111/cea.12238.

van der Vlugt, L.E.P.M., S. Haeberlein, W. de Graaf, T.E.D. Martha, and H.H. Smits. 2014b. Toll-like receptor ligation for the induction of regulatory B cells. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 1190:127–141. doi:10.1007/978-1-4939-1161-5_10.

van Gisbergen, K.P.J.M., P.L. Klarenbeek, N.A.M. Kragten, P.-P.A. Unger, M.B.B. Nieuwenhuis, F.M. Wensveen, A. ten Brinke, P.P. Tak, E. Eldering, M.A. Nolte, and R.A.W. van Lier. 2011. The costimulatory molecule CD27 maintains clonally diverse CD8(+) T cell responses of low antigen affinity to protect against viral variants. *Immunity.* 35:97–108. doi:10.1016/j.immuni.2011.04.020.

van Montfrans, J.M., A.I.M. Hoepelman, S. Otto, M. van Gijn, L. van de Corput, R.A. de Weger, L. Monaco-Shawver, P.P. Banerjee, E.A.M. Sanders, C.M. Jol-van der Zijde, M.R. Betts, J.S. Orange, A.C. Bloem, and K. Tesselaar. 2012. CD27 deficiency is associated with combined immunodeficiency and persistent symptomatic EBV viremia. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129:787–793.e6. doi:10.1016/j.jaci.2011.11.013.

Vaux, D.L., and J. Silke. 2005. IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:287–297. doi:10.1038/nrm1621.

Vaysberg, M., S.L. Lambert, S.M. Krams, and O.M. Martinez. 2009. Activation of the JAK/STAT pathway in Epstein Barr virus+-associated posttransplant lymphoproliferative disease: role of interferon-gamma. *Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg.* 9:2292–2302. doi:10.1111/j.1600-6143.2009.02781.x.

van de Veen, W., B. Stanic, O.F. Wirz, K. Jansen, A. Globinska, and M. Akdis. 2016. Role of regulatory B cells in immune tolerance to allergens and beyond. *J. Allergy Clin. Immunol.* 138:654–665. doi:10.1016/j.jaci.2016.07.006.

Verhoeven, R.J.A., S. Tong, G. Zhang, J. Zong, Y. Chen, D.-Y. Jin, M.-R. Chen, J. Pan, and H. Chen. 2016. NF- κ B Signaling Regulates Expression of Epstein-Barr Virus BART MicroRNAs and Long Noncoding RNAs in Nasopharyngeal Carcinoma. *J. Virol.* 90:6475–6488. doi:10.1128/JVI.00613-16.

Vieira, P., R. de Waal-Malefyt, M.N. Dang, K.E. Johnson, R. Kastelein, D.F. Fiorentino, J.E.

- deVries, M.G. Roncarolo, T.R. Mosmann, and K.W. Moore. 1991. Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:1172–1176.
- Vocanson, M., A. Rozieres, A. Hennino, G. Poyet, V. Gaillard, S. Renaudineau, A. Achachi, J. Benetiere, D. Kaiserlian, B. Dubois, and J.-F. Nicolas. 2010. Inducible costimulator (ICOS) is a marker for highly suppressive antigen-specific T cells sharing features of TH17/TH1 and regulatory T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 126:280–289, 289.e1–7. doi:10.1016/j.jaci.2010.05.022.
- Vockerodt, M., B. Haier, P. Buttgereit, H. Tesch, and D. Kube. 2001. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces interleukin-10 in Burkitt's lymphoma cells but not in Hodgkin's cells involving the p38/SAPK2 pathway. *Virology.* 280:183–198. doi:10.1006/viro.2000.0768.
- Vockerodt, M., S.L. Morgan, M. Kuo, W. Wei, M.B. Chukwuma, J.R. Arrand, D. Kube, J. Gordon, L.S. Young, C.B. Woodman, and P.G. Murray. 2008. The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J. Pathol.* 216:83–92. doi:10.1002/path.2384.
- Vonsover, A., G. Rechavi, A. Kesler, Y. Rapaport, F. Brok-Simoni, F. Mileguir, B. Ramot, and T. Gotlieb-Stematsky. 1991. EBV genome and immunoglobulin gene rearrangement in the differential diagnosis of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma. *Med. Pediatr. Oncol.* 19:246–252.
- Voo, K.S., T. Fu, H.E. Heslop, M.K. Brenner, C.M. Rooney, and R.-F. Wang. 2002. Identification of HLA-DP3-restricted peptides from EBNA1 recognized by CD4(+) T cells. *Cancer Res.* 62:7195–7199.
- Voo, K.S., Y.-H. Wang, F.R. Santori, C. Boggiano, Y.-H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D.R. Littman, and Y.-J. Liu. 2009. Identification of IL-17-producing FOXP3+ regulatory T cells in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:4793–4798. doi:10.1073/pnas.0900408106.
- Waldman, W.J., M.V. Williams, S. Lemeshow, P. Binkley, D. Guttridge, J.K. Kiecolt-Glaser, D.A. Knight, K.J. Ladner, and R. Glaser. 2008. Epstein-Barr virus-encoded dUTPase enhances proinflammatory cytokine production by macrophages in contact with endothelial cells: Evidence for depression-induced atherosclerotic risk. *Brain. Behav. Immun.* 22:215–223. doi:10.1016/j.bbi.2007.07.007.
- Waltzer, L., P.Y. Bourillot, A. Sergeant, and E. Manet. 1995. RBP-J kappa repression activity

is mediated by a co-repressor and antagonized by the Epstein-Barr virus transcription factor EBNA2. *Nucleic Acids Res.* 23:4939–4945.

Waltzer, L., F. Logeat, C. Brou, A. Israel, A. Sergeant, and E. Manet. 1994. The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J.* 13:5633–5638.

Wan, Y.Y., and R.A. Flavell. 2005. Identifying Foxp3-expressing suppressor T cells with a bicistronic reporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:5126–5131. doi:10.1073/pnas.0501701102.

Wang, F., W. Chen, P. Liu, J. Zhou, B. Liu, W. Ye, W. Wang, and X. Shen. 2017. Lentivirus-mediated RNAi knockdown of LMP2A inhibits the growth of the Epstein-Barr-associated gastric carcinoma cell line GT38 in vitro. *Exp. Ther. Med.* 13:187–193. doi:10.3892/etm.2016.3954.

Wang, L., J. Ren, G. Li, J.P. Moorman, Z.Q. Yao, and S. Ning. 2016a. LMP1 signaling pathway activates IRF4 in latent EBV infection and a positive circuit between PI3K and Src is required. *Oncogene.* doi:10.1038/onc.2016.380.

Wang, R.-X., C.-R. Yu, I.M. Dambuza, R.M. Mahdi, M.B. Dolinska, Y.V. Sergeev, P.T. Wingfield, S.-H. Kim, and C.E. Egwuagu. 2014a. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* 20:633–641. doi:10.1038/nm.3554.

Wang, R.-X., C.-R. Yu, I.M. Dambuza, R.M. Mahdi, M.B. Dolinska, Y.V. Sergeev, P.T. Wingfield, S.-H. Kim, and C.E. Egwuagu. 2014b. Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* 20:633–641. doi:10.1038/nm.3554.

Wang, X., F. Teng, L. Kong, and J. Yu. 2016b. PD-L1 expression in human cancers and its association with clinical outcomes. *OncoTargets Ther.* 9:5023–5039. doi:10.2147/OTT.S105862.

Wang, Z., J.-Q. Liu, Z. Liu, R. Shen, G. Zhang, J. Xu, S. Basu, Y. Feng, and X.-F. Bai. 2013. Tumor-derived IL-35 promotes tumor growth by enhancing myeloid cell accumulation and angiogenesis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 190:2415–2423. doi:10.4049/jimmunol.1202535.

Watry, D., J.A. Hedrick, S. Siervo, G. Rhodes, J.J. Lamberti, J.D. Lambris, and C.D. Tsoukas. 1991. Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J. Exp. Med.* 173:971–980.

Weber-Nordt, R.M., C. Egen, J. Wehinger, W. Ludwig, V. Gouilleux-Gruart, R. Mertelsmann, and J. Finke. 1996. Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood.* 88:809–816.

- Wehr, C., T. Kivioja, C. Schmitt, B. Ferry, T. Witte, E. Eren, M. Vlkova, M. Hernandez, D. Detkova, P.R. Bos, G. Poerksen, H. von Bernuth, U. Baumann, S. Goldacker, S. Gutenberger, M. Schlesier, F. Bergeron-van der Cruyssen, M. Le Garff, P. Debré, R. Jacobs, J. Jones, E. Bateman, J. Litzman, P.M. van Hagen, A. Plebani, R.E. Schmidt, V. Thon, I. Quinti, T. Espanol, A.D. Webster, H. Chapel, M. Vihinen, E. Oksenhendler, H.H. Peter, and K. Warnatz. 2008. The EUROclass trial: defining subgroups in common variable immunodeficiency. *Blood*. 111:77–85. doi:10.1182/blood-2007-06-091744.
- Wei, B., P. Velazquez, O. Turovskaya, K. Spricher, R. Aranda, M. Kronenberg, L. Birnbaumer, and J. Braun. 2005. Mesenteric B cells centrally inhibit CD4+ T cell colitis through interaction with regulatory T cell subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:2010–2015. doi:10.1073/pnas.0409449102.
- Wei, K., Y. Xu, J. Liu, W. Zhang, and Z. Liang. 2011. Histopathological classification of nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*. 12:1141–1147.
- Weiss, L.M., L.A. Movahed, R.A. Warnke, and J. Sklar. 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 320:502–506. doi:10.1056/NEJM198902233200806.
- White, R.E., I.J. Groves, E. Turro, J. Yee, E. Kremmer, and M.J. Allday. 2010. Extensive cooperation between the Epstein-Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PloS One*. 5:e13979. doi:10.1371/journal.pone.0013979.
- Wildin, R.S., F. Ramsdell, J. Peake, F. Faravelli, J.L. Casanova, N. Buist, E. Levy-Lahad, M. Mazzella, O. Goulet, L. Perroni, F.D. Bricarelli, G. Byrne, M. McEuen, S. Proll, M. Appleby, and M.E. Brunkow. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27:18–20. doi:10.1038/83707.
- Williams, H., and D.H. Crawford. 2006. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood*. 107:862–869. doi:10.1182/blood-2005-07-2702.
- Williams, H., K. McAulay, K.F. Macsween, N.J. Gallacher, C.D. Higgins, N. Harrison, A.J. Swerdlow, and D.H. Crawford. 2005. The immune response to primary EBV infection: a role for natural killer cells. *Br. J. Haematol.* 129:266–274. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05452.x.
- Williams, K.C., E. Ulvestad, and W.F. Hickey. 1994. Immunology of multiple sclerosis. *Clin. Neurosci. N. Y. N.* 2:229–245.
- Wilson, A.D., and A.J. Morgan. 2002. Primary immune responses by cord blood CD4(+) T

cells and NK cells inhibit Epstein-Barr virus B-cell transformation in vitro. *J. Virol.* 76:5071–5081.

Wilson, A.D., I. Redchenko, N.A. Williams, and A.J. Morgan. 1998. CD4+ T cells inhibit growth of Epstein-Barr virus-transformed B cells through CD95-CD95 ligand-mediated apoptosis. *Int. Immunol.* 10:1149–1157.

Wolf, H., H. zur Hausen, and V. Becker. 1973. EB viral genomes in epithelial nasopharyngeal carcinoma cells. *Nature. New Biol.* 244:245–247.

Wolf, S.D., B.N. Dittel, F. Hardardottir, and C.A. Janeway. 1996a. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* 184:2271–2278.

Wolf, S.D., B.N. Dittel, F. Hardardottir, and C.A. Janeway. 1996b. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Induction in Genetically B Cell-deficient Mice. *J. Exp. Med.* 184:2271–2278.

Wolf, S.F., D. Sieburth, and J. Sypek. 1994. Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 12:154–168. doi:10.1002/stem.5530120203.

Wong, J., R. Obst, M. Correia-Neves, G. Losyev, D. Mathis, and C. Benoist. 2007. Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4+ T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 178:7032–7041.

Wood, V.H.J., J.D. O’Neil, W. Wei, S.E. Stewart, C.W. Dawson, and L.S. Young. 2007. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGFbeta signaling pathways. *Oncogene.* 26:4135–4147. doi:10.1038/sj.onc.1210496.

Worth, A.J.J., C.J. Houldcroft, and C. Booth. 2016. Severe Epstein–Barr virus infection in primary immunodeficiency and the normal host. *Br. J. Haematol.* 175:559–576. doi:10.1111/bjh.14339.

Wroblewski, J.M., A. Copple, L.P. Batson, C.D. Landers, and J.R. Yannelli. 2002. Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *J. Immunol. Methods.* 264:19–28.

Wu, K., Y. Bi, K. Sun, and C. Wang. 2007. IL-10-producing type 1 regulatory T cells and allergy. *Cell. Mol. Immunol.* 4:269–275.

Wu, L., and L.M. Hutt-Fletcher. 2007. Point mutations in EBV gH that abrogate or differentially affect B cell and epithelial cell fusion. *Virology.* 363:148–155. doi:10.1016/j.virol.2007.01.025.

- Xing, W., K. Dresser, R. Zhang, A.M. Evens, H. Yu, B.A. Woda, and B.J. Chen. 2016. PD-L1 expression in EBV-negative diffuse large B-cell lymphoma: clinicopathologic features and prognostic implications. *Oncotarget*. 7:59976–59986. doi:10.18632/oncotarget.11045.
- Xu, J., J. Menezes, U. Prasad, and A. Ahmad. 1999. Elevated serum levels of transforming growth factor beta1 in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma patients. *Int. J. Cancer*. 84:396–399.
- Yamada, S., K. Shinozaki, and K. Agematsu. 2002. Involvement of CD27/CD70 interactions in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity by perforin-mediated cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* 130:424–430.
- Yanaba, K., J.-D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, and T.F. Tedder. 2009. The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 182:7459–7472. doi:10.4049/jimmunol.0900270.
- Yang, F.C., K. Agematsu, T. Nakazawa, T. Mori, S. Ito, T. Kobata, C. Morimoto, and A. Komiyama. 1996. CD27/CD70 interaction directly induces natural killer cell killing activity. *Immunology*. 88:289–293.
- Yang, X., J. Yang, Y. Chu, J. Wang, M. Guan, X. Zhu, Y. Xue, and H. Zou. 2013. T Follicular Helper Cells Mediate Expansion of Regulatory B Cells via IL-21 in Lupus-Prone MRL/lpr Mice. *PLoS ONE*. 8. doi:10.1371/journal.pone.0062855.
- Yao, Y., J. Vent-Schmidt, M.D. McGeough, M. Wong, H.M. Hoffman, T.S. Steiner, and M.K. Levings. 2015. Tr1 Cells, but Not Foxp3+ Regulatory T Cells, Suppress NLRP3 Inflammasome Activation via an IL-10-Dependent Mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. 195:488–497. doi:10.4049/jimmunol.1403225.
- Yates, J.L., N. Warren, and B. Sugden. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature*. 313:812–815.
- Ye, Z., H. Huang, S. Hao, S. Xu, H. Yu, S. Van Den Hurk, and J. Xiang. 2007. IL-10 has a distinct immunoregulatory effect on naive and active T cell subsets. *J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res.* 27:1031–1038. doi:10.1089/jir.2006.0144.
- Yi, F., A. Saha, M. Murakami, P. Kumar, J.S. Knight, Q. Cai, T. Choudhuri, and E.S. Robertson. 2009. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C targets p53 and modulates its transcriptional and apoptotic activities. *Virology*. 388:236–247. doi:10.1016/j.virol.2009.03.027.
- Yokoyama, A., M. Tanaka, G. Matsuda, K. Kato, M. Kanamori, H. Kawasaki, H. Hirano, I.

- Kitabayashi, M. Ohki, K. Hirai, and Y. Kawaguchi. 2001. Identification of major phosphorylation sites of Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein (EBNA-LP): ability of EBNA-LP to induce latent membrane protein 1 cooperatively with EBNA-2 is regulated by phosphorylation. *J. Virol.* 75:5119–5128. doi:10.1128/JVI.75.11.5119-5128.2001.
- Yokoyama, S., D. Staunton, R. Fisher, M. Amiot, J.J. Fortin, and D.A. Thorley-Lawson. 1991. Expression of the Blast-1 activation/adhesion molecule and its identification as CD48. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 146:2192–2200.
- Yoshizaki, A., T. Miyagaki, D.J. DiLillo, T. Matsushita, M. Horikawa, E.I. Kountikov, R. Spolski, J.C. Poe, W.J. Leonard, and T.F. Tedder. 2012. Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature.* 491:264–268. doi:10.1038/nature11501.
- Young, L.S., J.R. Arrand, and P.G. Murray. 2007. EBV gene expression and regulation. In *Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis.* A. Arvin, G. Campadelli-Fiume, E. Mocarski, P.S. Moore, B. Roizman, R. Whitley, and K. Yamanishi, editors. Cambridge University Press, Cambridge.
- Young, L.S., C.W. Dawson, and A.G. Eliopoulos. 2000. The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol. Pathol. MP.* 53:238–247.
- Young, L.S., and P.G. Murray. 2003. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene.* 22:5108–5121. doi:10.1038/sj.onc.1206556.
- Young, L.S., and A.B. Rickinson. 2004. Epstein–Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer.* 4:757–768. doi:10.1038/nrc1452.
- Young, R.M., A.L. Shaffer, J.D. Phelan, and L.M. Staudt. 2015. B-cell receptor signaling in diffuse large B-cell lymphoma. *Semin. Hematol.* 52:77–85. doi:10.1053/j.seminhematol.2015.01.008.
- Zeidler, R., G. Eissner, P. Meissner, S. Uebel, R. Tampé, S. Lazis, and W. Hammerschmidt. 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood.* 90:2390–2397.
- Zhang, H., H. Kong, X. Zeng, L. Guo, X. Sun, and S. He. 2014. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J. Transl. Med.* 12:125. doi:10.1186/1479-5876-12-125.
- Zhang, L., K. Hong, J. Zhang, and J.S. Pagano. 2004. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology.* 323:141–152. doi:10.1016/j.virol.2004.03.007.
- Zhang, M., H. Sun, S. Zhao, Y. Wang, H. Pu, Y. Wang, and Q. Zhang. 2017a. Expression of

PD-L1 and prognosis in breast cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*. 8:31347–31354. doi:10.18632/oncotarget.15532.

Zhang, Y.-M., Y. Yu, and H.-P. Zhao. 2017b. EBV-BART-6-3p and cellular microRNA-197 compromise the immune defense of host cells in EBV-positive Burkitt lymphoma. *Mol. Med. Rep.* 15:1877–1883. doi:10.3892/mmr.2017.6173.

Zhivaki, D., S. Lemoine, A. Lim, A. Morva, P.-O. Vidalain, L. Schandene, N. Casartelli, M.-A. Rameix-Welti, P.-L. Hervé, E. Dériaud, B. Beitz, M. Ripaux-Lefevre, J. Miatello, B. Lemercier, V. Lorin, D. Descamps, J. Fix, J.-F. Eléouët, S. Riffault, O. Schwartz, F. Porcheray, F. Mascart, H. Mouquet, X. Zhang, P. Tissières, and R. Lo-Man. 2017. Respiratory Syncytial Virus Infects Regulatory B Cells in Human Neonates via Chemokine Receptor CX3CR1 and Promotes Lung Disease Severity. *Immunity*. 46:301–314. doi:10.1016/j.immuni.2017.01.010.

Zhu, H.-Q., R.-C. Xu, Y.-Y. Chen, H.-J. Yuan, H. Cao, X.-Q. Zhao, J. Zheng, Y. Wang, and M. Pan. 2015. Impaired function of CD19(+) CD24(hi) CD38(hi) regulatory B cells in patients with pemphigus. *Br. J. Dermatol.* 172:101–110. doi:10.1111/bjd.13192.

Zitvogel, L., and G. Kroemer. 2012. Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 1:1223–1225. doi:10.4161/onci.21335.

Zuo, L., H. Yu, L. Liu, Y. Tang, H. Wu, J. Yang, M. Zhu, S. Du, L. Zhao, L. Cao, G. Li, and J. Lu. 2015. The copy number of Epstein-Barr virus latent genome correlates with the oncogenicity by the activation level of LMP1 and NF- κ B. *Oncotarget*. 6:41033–41044. doi:10.18632/oncotarget.5708.

zur Stadt, U., J. Rohr, W. Seifert, F. Koch, S. Grieve, J. Pagel, J. Strauß, B. Kasper, G. Nürnberg, C. Becker, A. Maul-Pavicic, K. Beutel, G. Janka, G. Griffiths, S. Ehl, and H.C. Hennies. 2009. Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis Type 5 (FHL-5) Is Caused by Mutations in Munc18-2 and Impaired Binding to Syntaxin 11. *Am. J. Hum. Genet.* 85:482–492. doi:10.1016/j.ajhg.2009.09.005.

zur Stadt, U., S. Schmidt, B. Kasper, K. Beutel, A.S. Diler, J.-I. Henter, H. Kabisch, R. Schneppenheim, P. Nürnberg, G. Janka, and H.C. Hennies. 2005. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11. *Hum. Mol. Genet.* 14:827–834. doi:10.1093/hmg/ddi076.

RÉSUMÉ

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est le premier virus transformant à avoir été identifié chez l'Homme. Il infecte plus de 90% de la population adulte mondiale, persistant sous forme épisodale dans le compartiment B mémoire tout au long de la vie de l'hôte. Lors de la primo-infection et lors de phases de réactivation du virus, les cellules B immortalisées sont en programme de latence III, aussi appelée phase de prolifération, où l'ensemble des protéines de latence sont exprimées. Lorsque les hôtes sont immunocompétents, un équilibre entre hôte et virus s'établit et la plupart des cellules B infectées sont éliminées par le système immunitaire de l'hôte, principalement par les lymphocytes T cytotoxiques. En cas de déficit immunitaire, il peut y avoir émergence de lymphomes, tels que les désordres lymphoprolifératifs des patients immunodéprimés (PTLDs), les lymphomes non-Hodgkiniens (LNH) et Hodgkiniens (LH). Les travaux antérieurs du laboratoire ont permis de mettre en évidence que l'immuno-inhibiteur PD-L1/B7-H1/CD274 est surexprimé à la surface des lymphocytes B en latence III de l'EBV. L'interleukine-10 (IL-10) est également sécrétée par ces cellules. Ces caractéristiques sont communes aux cellules B régulatrices (Bregs). Le but de ma thèse était d'interroger les caractéristiques immuno-modulatrices des cellules B en latence III de l'EBV, dans le cadre des propriétés des Bregs. Nous montrons que les cellules B en latence III de l'EBV possèdent les déterminants antigéniques communs aux Bregs immatures ($CD24^{High} CD38^{High} PD-L1^{High}$), associée à une surexpression des cytokines immunosuppressives cardinales des Bregs (IL-10, TGF- β 1 et IL-35). Nous montrons que les cellules B en latence III de l'EBV peuvent conduire à la mort des cellules T CD4 autologues, ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération des lymphocytes T CD4 et CD8, au profit de l'expansion de lymphocytes T régulateurs (Tregs). Nous avons trouvé que cette expansion est médiée par l'axe PD-1/PD-L1. Ces travaux mettent en évidence un nouveau mécanisme de l'EBV concernant le détournement du système immunitaire de l'hôte, augmentant ses capacités oncogéniques.

MOTS-CLÉS : EBV, latence III, IL-10, immunosuppression, Bregs, Tregs, axe PD-1/PD-L1

ABSTRACT

The Epstein-Barr virus (EBV) is the first transforming virus discovered in humans. It infects more than 90% of the global adult population, persisting in an episomal form in the memory B-cell compartment throughout the life of the host. During primo-infection and during phases of viral reactivation, immortalized B-cells are in latency III, also called the proliferation program, in which the full range of latency proteins are expressed. In immunocompetent subjects, a balance between virus and host is established, and most infected B-cells are eliminated by the host's immune system, mainly by cytotoxic T lymphocytes. Deficit of the immune system may lead to lymphomagenesis, such as post-transplantation lymphoproliferative disorders (PTLDs), non-Hodgkin's (NHL) or Hodgkin's lymphomas (HL). Previous studies in the lab revealed that the immuno-inhibitor PD-L1/B7-H1/CD274 was overexpressed on the surface of EBV latency III B-cells. Interleukin-10 (IL-10) was also secreted by these cells. These features are shared with regulatory B-cells (Bregs). Our objective was to examine the immunomodulatory features of EBV latency III B-cells, in the frame of Breg properties. We found that EBV latency III B-cells possessed the antigenic determinants common to immature Bregs ($CD24^{High} CD38^{High} PD-L1^{High}$), associated with overexpression of Breg immunosuppressive cytokines (IL-10, TGF- β 1 and IL-35). EBV latency III B-cells led to death of autologous CD4 T-cells, as well as inhibition of CD4 and CD8 T-lymphocyte proliferation, favoring regulatory T-cell (Treg) expansion. We found that this expansion was mediated by the PD-1/PD-L1 axis. This study highlights a new mechanism of EBV for the diversion of the host immune system thereby increasing its oncogenic properties.

KEY WORDS: EBV, latency III, IL-10, immunosuppression, Bregs, Tregs, PD-1/PD-L1 axis