

Lymphoproliférations T associées au virus d'Epstein-Barr

Claire Montpellier
Hervé Groux
Claude Auriault
Jean Coll

Depuis sa découverte en 1964 dans une lignée de lymphome de Burkitt africain, le virus d'Epstein-Barr (EBV) a été identifié dans de nombreuses autres maladies telles la mononucléose infectieuse, le carcinome du nasopharynx et la maladie de Hodgkin. Dans les proliférations lymphoïdes bénignes ou malignes, il est classiquement associé aux lymphocytes B. Cependant, les observations montrant la présence de ce virus dans des lymphomes T non hodgkiniens et dans des leucémies T sont de plus en plus nombreuses. La transformation *in vitro* de lymphocytes B humains par l'EBV en lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (LCL) est devenue routinière. On sait, à présent, qu'il est possible de transformer *in vitro* des lymphocytes T humains par l'EBV. Dans ces lignées T d'un phénotype naïf, le virus exprime les gènes *EBNA 1* et *LMPI*. Cette présence est également retrouvée de façon majoritaire dans les maladies T associées à l'EBV. L'étude de ces cellules T transformées devrait favoriser la compréhension du rôle joué par l'EBV dans les lymphoproliférations T.

ADRESSES

C. Montpellier: *docteur ès sciences*. Mécanismes du développement et de la cancérisation, UMR 319 Cnrs/Institut Pasteur de Lille, Institut de biologie de Lille, 1, rue du Professeur-Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France. H. Groux: *chargé de recherche au Cnrs*. C. Auriault: *directeur de recherche au Cnrs*. J. Coll: *chargé de recherche à l'Inserm*. Immunopathologie cellulaire des maladies infectieuses, URÀ 1854 Cnrs/Institut Pasteur de Lille, Institut de biologie de Lille, 1, rue du Professeur-Calmette, BP 447, 59021 Lille Cedex, France.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un herpèsvirus qui infecte plus de 90 % de la population adulte. La première infection survient en principe après contact salivaire, souvent pendant l'enfance ou l'adolescence, et les lymphocytes B infectés par le biais de leur récepteur CD21 de l'EBV sont activés et prolifèrent de façon polyclonale. Cette prolifération est contrôlée par les cellules T cytotoxiques de l'hôte qui détruisent spécifiquement les lymphocytes B infec-

tés. Alors que la première infection par l'EBV est presque toujours asymptomatique dans l'enfance, elle conduit à la mononucléose infectieuse (dans plus de 50 % des cas selon certaines études) quand elle intervient à l'adolescence ou chez le jeune adulte.

On a observé l'implication de plus en plus fréquente de l'EBV dans les proliférations lymphoïdes (*voir* [1] pour revue générale). Cette augmentation apparaît en grande partie liée à la plus grande fréquence des déficits

immunitaires acquis, médicamenteux ou viraux. Outre le lymphome de Burkitt, pour lequel l'implication de l'EBV est reconnue depuis la découverte du virus dans une lignée cellulaire d'origine africaine [2], on a également montré la présence du virus dans d'autres catégories de lymphomes, hodgkiniens ou non, ainsi que dans les cellules épithéliales des carcinomes du nasopharynx. L'EBV est aussi capable d'établir des lignées cellulaires lymphoblastoïdes B (LCL) après infection de cellules mononucléées du sang périphérique. Bien que l'interaction entre l'EBV et les lymphocytes T reste mal connue, les observations montrant la présence de l'EBV dans certains lymphomes T humains sont de plus en plus nombreuses. C'est ainsi qu'un lien a été établi entre les lymphomes T nasaux, les lymphomes T angio-immunoblastiques et d'autres lymphomes T notamment.

Excepté dans les cellules épithéliales de l'oropharynx – site primaire de l'infection virale par contamination salivaire et lieu privilégié de la réplication virale – il n'y a pas en général de cycle productif dans les cellules infectées par l'EBV, et le profil d'expression des gènes viraux définit trois types de latences (I, II et III) (figure 1). La latence I, décrite dans

des lymphomes de Burkitt positifs pour l'EBV, est définie par la synthèse unique de la protéine nucléaire EBNA 1. La latence II, d'abord mise en évidence dans les cellules de carcinomes du nasopharynx, et également observée dans les cellules de la maladie de Hodgkin, est définie quant à elle par la synthèse, en plus de EBNA 1, des trois protéines de membrane LMP1, LMP2A et LMP2B. La latence III est définie par la synthèse des six protéines nucléaires EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C et LP, et des trois protéines membranaires LMP. On retrouve ce type de latence dans les LCL transformées *in vitro* par l'EBV. Dans ces trois types de latence, la synthèse des protéines viraux s'accompagne de l'expression des ARN EBER et BamHI A/BARF0 [1].

L'EBV et les lymphoproliférations T *in vivo*

Cellules T positives pour EBV *in vivo*

La détection d'ADN de l'EBV dans les cellules circulantes T d'un enfant atteint de symptômes chroniques de mononucléose infectieuse [3] et dans d'occasionnels lymphomes T [4] a montré pour la première fois

que l'EBV, longtemps considéré comme un agent lymphotropique strictement B, pouvait, dans certaines circonstances, entrer dans un compartiment cellulaire T. Plus récemment, des lignées cellulaires T positives pour l'EBV ont été établies à partir de PBL (*peripheral blood lymphocytes*) de patients présentant une infection sévère chronique à l'EBV [5]. Ces quatre lignées cellulaires portent le génome viral sous forme épisomique. Elles expriment une latence de type II. Les résultats de ces études suggèrent que l'EBV peut cibler et infecter des cellules T de façon latente, quelle que soit l'étape de différenciation *in vivo*, et provoquer ainsi une prolifération cellulaire T incontrôlée *ex vivo*. Depuis les premières détections, le statut de l'EBV a été examiné dans un grand nombre de maladies cellulaires T.

Principaux lymphomes T associés à l'EBV

Lymphomes T et syndromes hémophagocytaires associés à l'EBV

Le syndrome hémophagocytaire (SH) correspond à une prolifération histiocyttaire mise en évidence au niveau des organes hématopoïétiques mais pouvant affecter n'importe quel viscère. Le SH a été observé au cours d'infections (virales en particulier), de néoplasies, d'hémopathies ou de maladies systémiques. Dans le cadre des hémopathies, on note une prédominance des lymphomes T, dont certains associés à l'EBV. Les signes histologiques et cliniques des SH associés à l'EBV (EBV-SH) sont différents des symptômes typiques de la mononucléose infectieuse. Ils ressemblent à ceux développés dans certains cas de syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X (SLX), une maladie immunodéficiente qui prédispose les jeunes garçons atteints à des maladies associées à l'EBV. Cependant, si dans ce dernier cas ce sont les lymphocytes B qui soient infectés par l'EBV, il semble bien que seuls les lymphocytes T le sont dans les EBV-SH [6, 7]. On pense que l'activation de l'expression de cytokines induites par l'infection virale des cellules T pourrait jouer un rôle dans la pathogénie et être notamment responsable de l'hémophagocy-

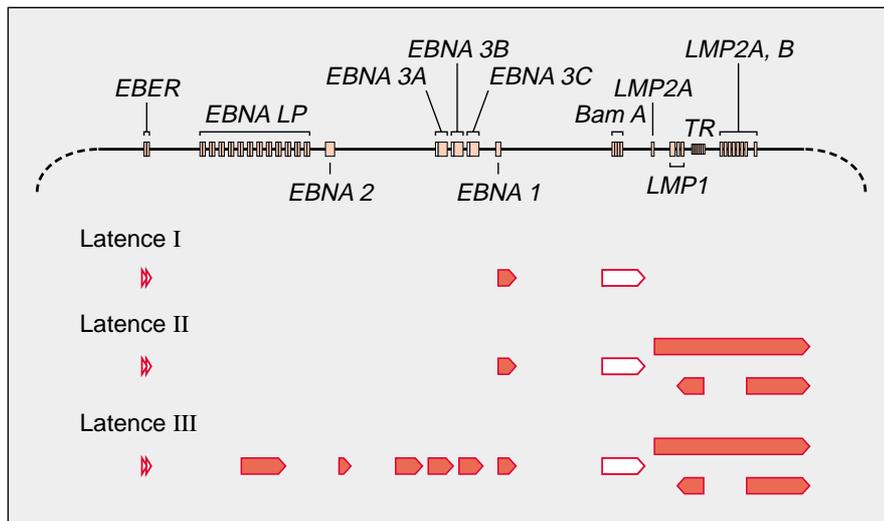


Figure 1. **Trois types de latence.** La latence I est définie par l'expression unique du gène EBNA 1 ; la latence II, outre l'expression de EBNA 1, se définit par l'expression des gènes codant pour les protéines de membrane LMP1, LMP2A et LMP2B ; au cours de la latence III, les six protéines nucléaires EBNA 1, 2, 3A, 3B, 3C et LP et les trois protéines membranaires LMP sont synthétisées. Les ARN EBER et Bam A sont exprimés dans les trois types de latence.

tose exagérée, observée dans ces maladies. Dans les EBV-SH, quelques cas de lymphomes T positifs pour l'EBV ont été décrits [8-10]. Les caractéristiques des cellules T infectées sont variables mais les proliférations de phénotype CD3⁺CD8⁺ sont prépondérantes.

Lymphomes T nasaux

Le lymphome T nasal est un lymphome T extraganglionnaire de type angiocentrique qui provoque un granulome mortel se traduisant par une érosion du tissu osseux. Plusieurs études effectuées au Japon, en Chine mais aussi dans les pays occidentaux ont montré que beaucoup de ces tumeurs présentaient un grand nombre de cellules infectées par l'EBV [11-16]. Des résultats récents suggèrent que les lymphomes nasaux dérivent de cellules lymphoïdes cytotoxiques infectées par l'EBV ayant comme origine, soit un lymphocyte T (caractérisé par un réarrangement du TCR), soit une cellule NK (*natural killer*, caractérisée par la présence du marqueur CD56) [17]. Bien que le premier rapport suggère un modèle d'expression des antigènes de l'EBV spécifique de la latence III dans ces lymphomes [11], d'autres études plus récentes ont montré l'expression sélective des transcrits caractéristiques d'une latence II [18].

Lymphoadénopathies angio-immunoblastiques et lymphomes à moyennes ou larges cellules pléomorphes

La recherche d'autres maladies T associées à la présence et à l'expression de l'EBV ont permis l'identification de deux types histologiques de lymphomes: les lymphomes apparentés aux lymphoadénopathies angio-immunoblastiques et les lymphomes à moyennes ou larges cellules pléomorphes [12, 13, 19]. A peu près 40 % de ces tumeurs, dans les deux catégories histologiques, montrent une positivité pour l'EBV. L'étude de l'expression des gènes viraux a révélé des différences entre les tumeurs, ce qui reflète probablement la nature hétérogène de ce groupe de lymphomes. La majorité semble ne pas synthétiser EBNA 2 et synthétiser pour LMP1. Certaines situations,

dans lesquelles l'EBV ne colonise qu'une fraction de la population cellulaire maligne, sont plutôt qualifiées d'infections « passagères ». Cependant, le fait que la fraction positive pour l'EBV soit souvent augmentée de façon substantielle dans la progression ou la réapparition de certaines tumeurs mosaïques [12] suggère que le virus peut conférer un avantage de croissance, même à des cellules déjà néoplasiques *in vivo*.

Autres lymphomes ou leucémies T associés à l'EBV

Les études ayant mis en évidence l'association entre l'EBV et les lymphomes T nasaux se sont également attachées à rechercher la présence du virus dans d'autres lymphomes T périphériques. Ces études sont très hétérogènes en termes de recrutement et de classification des cas étudiés. Néanmoins, les lymphomes T infectés par l'EBV sont issus de l'expansion clonale d'une cellule infectée et ils arborent majoritairement un profil d'expression des gènes viraux caractéristique d'un type de latence II [20]. Il est à noter, cependant, que l'on a décrit quelques cas de lymphomes et de leucémies lymphocytaires chroniques présentant une latence de type I [21].

Ces études démontrent également que ces lymphomes T associés à l'EBV, morphologiquement indistinguables de ceux négatifs pour l'EBV, sont généralement restreints à des sites particuliers [15]. La région principale de localisation des lymphomes infectés par l'EBV est la sphère ORL dont les lymphomes T nasaux forment l'entité la mieux répertoriée, mais incluant également, par exemple, des cas récemment décrits de lymphomes de glandes salivaires [22]. Dans ce dernier cas, la présence d'une infection lytique a été détectée dans les cellules épithéliales non malignes de ces lymphomes T. Cela suggère que les cellules T infectées par l'EBV sont une source d'infection pour les cellules épithéliales et qu'elles induisent la réplication virale dans ces cellules épithéliales par le biais d'une interaction cellulaire ou de facteurs solubles. Il est possible aussi que ce soit l'infection lytique de l'EBV dans les cellules épithéliales de

glandes salivaires qui ait conduit à ces lymphomes T locaux. Selon la seconde hypothèse, le contact fréquent et répété avec une zone de réplication active pourrait être une des raisons du développement de lymphomes T infectés à localisation préférentielle. Dans le même ordre d'idée, il faut noter l'identification récente de rares lymphomes T positifs pour l'EBV survenant dans la cavité orale de patients immunodéprimés en association avec des lésions de leucoplasie orale chevelue [23].

A contrario, ces études montrent une négativité ou une faible incidence de la présence du virus dans d'autres lymphomes tels que les lymphomes pulmonaires, gastro-intestinaux ou cutanés [19, 21].

Il faut enfin noter une incidence importante de la présence d'EBV (17% des cas étudiés) dans des ATLL (*adult T-cell leukemia/lymphoma*), une tumeur liée à l'expression oncogénique du rétrovirus HTLV-1 et se développant de façon endémique dans certains territoires du Sud-Est japonais et aux Caraïbes [24]. Le profil d'expression du virus dans ces cellules est une variante de la latence II dans laquelle EBNA 2 est également synthétisée et qu'on retrouve par exemple dans les lymphomes B des transplantés. Il ressort de cette étude qu'une infection conjointe par l'EBV et HTLV-1 pourrait jouer un rôle dans l'ontogenèse des ATLL.

En résumé, le lien entre l'EBV et les lymphoproliférations T suggère que ce virus est un agent oncogénique présumé pour les cellules T s'il peut accéder à ce lignage cellulaire *in vivo*. Un événement de cet ordre semble ne se produire que très rarement et être considéré comme un risque particulier. Ce dernier dépend de la proximité des sites de réplication/infection, du statut d'activation des cellules cibles et de la prépondérance de co-facteurs immunologiques ou infectieux facilitateurs.

Le *Tableau I* résume les liens entre différentes maladies T et l'EBV.

L'EBV et l'infection de cellules T in vitro

La voie d'accès du virus

Le récepteur de l'EBV, le CD21, encore appelé CR2 (*complement recep-*

Tableau I
MALADIES LYMPHOCYTAIRES T ET EBV

Maladie T	Positivité pour l'EBV	Latence	Références
Lymphomes T non hodgkiniens			
Lymphomes T non répertoriés	quelques cas	I	[21]
Lymphomes T périphériques	+	II	[20]
Lymphocytoses et lymphomes T associés aux syndromes hémophagocytaires associés à l'EBV	quelques cas		[6-10]
Lymphomes T extraganglionnaires			
– Lymphomes T nasaux	+	II ou III	[11-15, 18, 20]
– Lymphomes T pulmonaires	peu		[15]
– Lymphomes T gastro-intestinaux	peu		[15]
– Lymphomes T cutanés primaires	–		[15]
Lymphomes angio-immunoblastiques et lymphomes apparentés aux lymphoadénopathies	40 % à 85 %	II	[12, 13, 19]
Lymphomes de Lennert	71 %		[19]
Lymphomes pléomorphes	36 %		[19]
– à petites cellules	?		
– à moyennes ou larges cellules	40 %	II	[12, 13]
Lymphomes anaplasiques à grandes cellules			
– cutanés	–		[19]
– lymphoblastiques	–		[19]
– positifs pour le CD30	–		[19]
Lymphomes T de glandes salivaires	+		[22]
Lymphomes T dans la cavité orale de patients immunodéprimés	+		[23]
Leucémies T			
ATLL (<i>adult T-cell leukemia/lymphoma</i>)	17 %	III	[24]
Leucémies lymphocytaires chroniques	quelques cas	I	[21]

tor de type 2), est présent à la surface des lymphocytes B et des cellules folliculaires dendritiques. Ce récepteur ou des molécules apparentées ont également été identifiés à la surface de cellules T leucémiques [25], de cellules T périphériques [26], de thymocytes [27, 28] et de lignées cellulaires T [29]. La réactivité de ces molécules à des ligands ou à des anticorps varie avec celle des lymphocytes B, ce qui

suggère des différences structurales entre les molécules du CR2 B ou T. On peut expliquer la variabilité de l'infection des cellules T par le fait que le CR2, bien qu'il soit requis, ne soit pas suffisant pour qu'il y ait infection (*m/s n° 4, vol. 11, p. 623*). D'autres facteurs comme des récepteurs de surface cellulaire additionnels ou des composants intracellulaires doivent intervenir. Cela semble

être le cas lors de l'infection des cellules B avec l'intervention de molécules DR du CMH de classe II. Il paraît clair que le CR2 ne peut être considéré comme l'unique voie d'entrée de l'EBV dans ces cellules. Des études ont montré notamment que l'infection par l'EBV de cellules de carcinomes gastriques humains implique un ou des récepteur(s) différent(s) du CR2 [30].

Infection par l'EBV

• Infection de thymocytes

Gelfand et son équipe (Denver, CO, USA) ont montré qu'EBV pouvait infecter une sous-population de thymocytes normaux [31]. Cette infection est accompagnée par l'apparition du génome de l'EBV sous forme linéaire après 8 heures d'infection. On n'observe pas la circularisation du génome de l'EBV, ce qui marque une différence significative avec l'infection dans les cellules B lors de laquelle le génome peut se circulariser après 24 heures. Les transcrits codant pour la glycoprotéine majeure du manteau de l'EBV, la gp350/220, ont été identifiés dans ces thymocytes infectés dans lesquels on a mis en évidence ni la présence des transcrits *LMP2A*, ni celle des transcrits *EBER 1*. Ces observations suggèrent que l'infection des thymocytes par l'EBV diffère de l'infection des cellules B. La principale différence est que, dans les thymocytes, rien ne permet de dire que le virus se circularise. L'EBV adopte une configuration linéaire permettant la transcription des gènes de réplication virale.

D'autres travaux de l'équipe de Gelfand ont mis le doigt sur l'infection possible de thymocytes *in vitro* par l'EBV [32]. Les auteurs relatent l'infection par l'EBV d'une lignée cellulaire humaine T, la lignée HPB-ALL, qui exprime un phénotype de cellule immature caractéristique des cellules T qui se développent dans le thymus. Des études réalisées par microscopie électronique montrent une internalisation rapide de l'EBV dans les cellules HPB. Comme dans le cas d'infection de thymocytes normaux, la présence intracellulaire de génomes linéaires de l'EBV et de composants du cycle répliatif viral a ensuite été montrée. L'expression des gènes tardifs de l'EBV à la surface cellulaire est transitoire.

• Infection de lymphocytes T primaires CD4⁺ ou CD8⁺

Des lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ provenant de donneurs adultes normaux, purifiés par cytométrie en flux, peuvent être infectés par l'EBV même en l'absence d'un CR2 [33]. L'efficacité de cette infection a été mise en évidence par l'accumulation dans ces

cellules de composants du cycle répliatif viral. La présence de l'EBV dans les cellules T CD4⁺ augmente la réplication virale du VIH (virus d'immunodéficience humaine) de type 1 IIIB dans des cellules co-infectées. Cette réplication est mesurée par l'accumulation de transcriptase inverse et la formation de syncytiums. Un petit pourcentage de cellules T CD8⁺ répliquent davantage VIH après infection par l'EBV. Ces résultats démontrent un lien direct entre l'EBV et le VIH-1 lors d'une co-infection de cellules T *in vitro* et peut expliquer l'augmentation de l'incidence des lymphomes T associés à l'EBV chez les patients atteints du SIDA (pour revue voir [34]).

• Infection de lignées cellulaires T

Des transcrits *EBNA 1* sont détectés dans des cellules Jurkat et HSB-2 cultivées en présence de l'EBV [35], ce qui témoigne d'une infectivité au moins transitoire de ces lignées *in vitro*. En revanche, l'EBV ne semble pas infecter les cellules T leucémiques Molt-4 en dépit de la capacité de ces cellules de se lier au virus [36]. Des tentatives plus récentes ont donné des résultats plus intéressants. En effet, des virus d'Epstein-Barr recombinants possédant un marqueur de sélection positive ont été utilisés pour l'infection d'une lignée T humaine infectée par le virus HTLV-1, la lignée MT2 [37, 38]. L'infection persistante de ces cellules s'est traduite par la première production *in vitro* d'un type de latence II. La croissance des cellules MT2 infectées par l'EBV est plus faible que celle des clones non transfectés, ce qui suggère que l'EBV peut affecter la régulation de la prolifération cellulaire T. Ces travaux montrent donc qu'une sélection positive de cellules infectées par l'EBV peut favoriser la réalisation de systèmes expérimentaux d'infection persistante dans des cellules non B.

Transformation *in vitro* de lymphocytes T humains par le virus d'Epstein-Barr

Outre les essais d'infection, des expressions transitoires de protéines virales ont été effectuées dans des lignées T ou des lymphocytes T primaires humains [39]. C'est ainsi que

des changements phénotypiques (expression des marqueurs de surface CD21, ICAM-1 et LFA-1 et changements morphologiques) sont induits lors de l'expression de LMP1 dans ces cellules. Tout récemment, on a montré qu'une expression stable de LMP1 dans des cellules Jurkat permet la survie cellulaire en l'absence de sérum [40]. LMP1 peut donc probablement contribuer au phénotype des cellules tumorales infectées par l'EBV non seulement dans des maladies d'origine B mais également dans des maladies T.

Pour être complet, il faut citer également une étude déjà ancienne décrivant l'établissement, à partir de sang de cordon, de deux lignées lymphoblastoïdes T humaines immortalisées après transfection d'un ADN viral purifié de la souche B95-8 de l'EBV [41]. Les cellules présentent un réarrangement complet des gènes du TCR (*T-cell receptor*) et n'ont pas besoin d'IL-2 pour leur croissance.

Cependant, malgré l'accumulation de tous ces résultats, la question fondamentale du rôle joué par l'EBV dans les proliférations lymphomateuses T, chez des individus immunocompétents ou non, restait posée. Si l'EBV est effectivement un agent causal ou un co-facteur essentiel de l'apparition de lymphomes T, même chez des individus immunocompétents, le virus devient une cible majeure de l'effort thérapeutique compte tenu de l'exposition chronique à l'infection par l'EBV de l'ensemble des individus d'une population humaine. Dans ce cas, l'évaluation de la pathogénicité du virus devrait être révisée et la mise en place de protocoles immunothérapeutiques et/ou immunoprophylactiques deviendrait une priorité évidente.

Cependant, les études sur le lien entre les lymphocytes T et l'EBV sont moins avancées que celles avec les lymphocytes B; il manque, en effet, pour les lymphocytes T un système *in vitro* équivalent aux LCL pour les cellules B.

Notre équipe (Ura 1854 Cnrs/Institut Pasteur de Lille) a réussi à isoler et à caractériser des clones lymphocytaires T transformés après infection *in vitro* par l'EBV [42] (figure 2).

Nous n'avons pu montrer qu'après l'infection de cellules périphériques

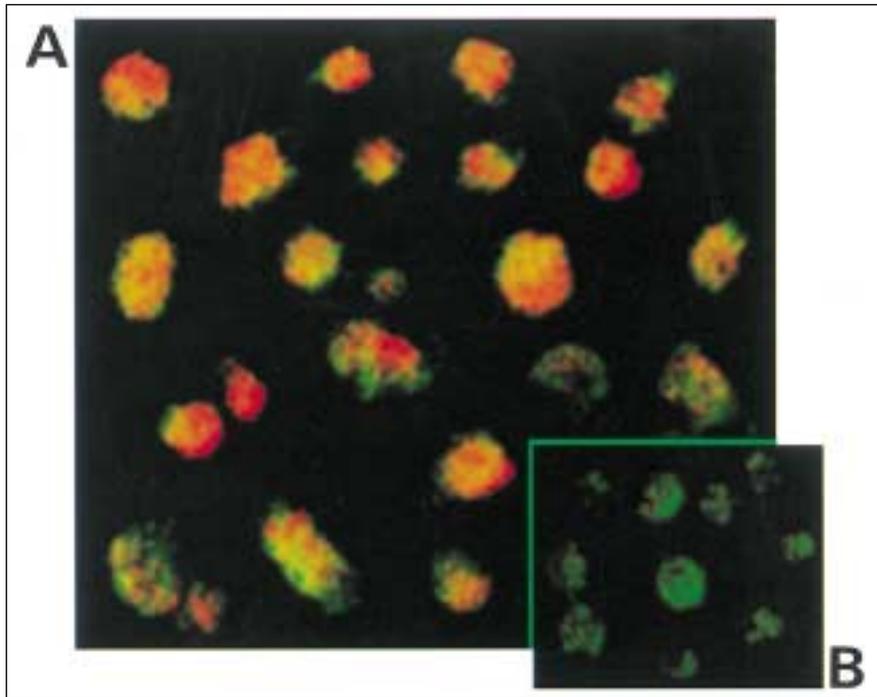


Figure 2. **Analyse confocale des cellules T périphériques transformées in vitro par l'EBV.** A. Clone cellulaire T (NC5) exprimant à la fois le marqueur cellulaire T CD3 (en vert) et la protéine virale LMP1 (en rouge). B. Isotype témoin.

par l'EBV une proportion très minime de cellules (1/5 000 environ) exprimant le marqueur CD3 peut être détectée au milieu de lymphocytes B immortalisés. Un protocole de sélection particulier a permis de préparer et de caractériser une vingtaine de clones provenant de trois donneurs différents. Ces grandes cellules de morphologie lymphoïde présentaient le phénotype immunologique caractéristique des lymphocytes T naïfs : CD3⁺ TCR⁺ CD4/8⁺ CD25⁺ CD45RA⁺ CD29⁻ CD44⁻ DR⁻ CD19⁻ CD20⁻ CD14⁻. Une analyse par PCR a révélé que différentes chaînes variables de la chaîne β du récepteur pour l'antigène sont exprimées (V β 8, V β 13, V β 11 notamment) démontrant que le processus de transformation est polyclonal sans préférence pour un variant de récepteur particulier. La preuve définitive que ces cellules « transformées » sont bien des lymphocytes T a été apportée par la mise en évidence dans ces cellules du réarrangement complet du récepteur T (et aucun réarrangement caractéristique de lymphocytes B).

Il apparaît clairement que le génome viral est présent dans les cellules sous

forme épisomique circulaire. Par ailleurs, parmi les ARN codant pour les protéines classiquement synthétisées en phase de latence lors de l'induction proliférative par l'EBV, seuls les ARN *EBNA 1* et *LMP1* sont présents. Ces cellules sécrètent de l'interleukine-2 en réponse à une activation classique. Enfin, et c'est la raison pour laquelle nous utilisons le terme « transformé » pour désigner le statut de ces cellules, l'injection à des souris immunodéficientes *RAG-2* ou *nude* entraîne la formation de tumeurs solides.

Une étude cytogénétique du clone NC5 et des cellules issues d'une tumeur solide induite après injection de ce clone à une souris immunodéprimée *RAG2*, les cellules TC, a montré dans ces deux types cellulaires deux translocations (t(2;15) (p22;q21) et t(9;12) (q12;p23)) et une délétion (en 10q24). L'étude de dérégulations de l'expression ou de remaniements éventuels de gènes présents dans ces régions réarrangées, et pouvant potentiellement être impliqués dans des processus de transformation, a été mise en route mais de nombreux gènes sont encore à analyser.

L'étude de l'expression d'un certain nombre de gènes connus pour être la cible d'événements d'activation cellulaire T ou dépendante de l'EBV a permis de mettre en évidence une expression du gène anti-apoptotique *BCL-X_L* et du gène de la thiorédoxine dans les NC5 et les TC. *BCL-X_L* pourrait jouer le rôle qu'occupe le gène anti-apoptotique *BCL-2* dans les LCL. La thiorédoxine est connue pour être activement transcrite dans de nombreux néoplasmes à étiologie virale (incluant l'EBV) mais aussi dans les lignées de lymphomes de Burkitt et dans les LCL. La thiorédoxine, grâce à ses pouvoirs d'oxydoréduction, semble potentialiser l'effet de quantités suboptimales de facteurs de croissance engagés dans un processus de prolifération autocrine. Enfin, l'analyse de l'activation des complexes transcriptionnels – NF- κ B, STAT – spécifiques des cellules T ou connus pour être activés par l'EBV a montré qu'aucun des deux n'est impliqué de façon constitutive dans les cellules NC5 et TC; la voie NF- κ B est toujours inductible dans ces cellules et est bien activée dans les cellules B du même donneur transformées par l'EBV. Ce résultat montre pour la première fois un découplage dans des cellules lymphoïdes entre l'expression de l'oncogène viral *LMP1* et l'activation du complexe transcriptionnel NF- κ B [43]. Ce résultat peut paraître surprenant étant donné le parallélisme très longtemps constaté entre effets physiologiques et transformants de *LMP1* et la signalisation NF- κ B. Deux régions du domaine cytoplasmique de la protéine LMP1 (CTAR1 et CTAR2) sont responsables de cette activation et certains médiateurs ont été récemment découverts. Il s'agit par exemple des adaptateurs TRAF et TRADD interagissant directement, respectivement, avec CTAR1 et CTAR2, et des complexes activant NF- κ B par phosphorylation de l'inhibiteur I κ B et incluant séquentiellement les kinases NIK et IKK α et β (*m/s n° 4, vol. 14, p. 511*) [44] (figure 3). Cependant, certaines expériences utilisant des mutants ont montré que cette activation NF- κ B n'est pas suffisante pour déclencher le pouvoir oncogénique de LMP1. A noter également qu'on a montré que l'induction par LMP1 du récepteur de l'EGF est dépendante de TRAF mais indépendante de l'activa-

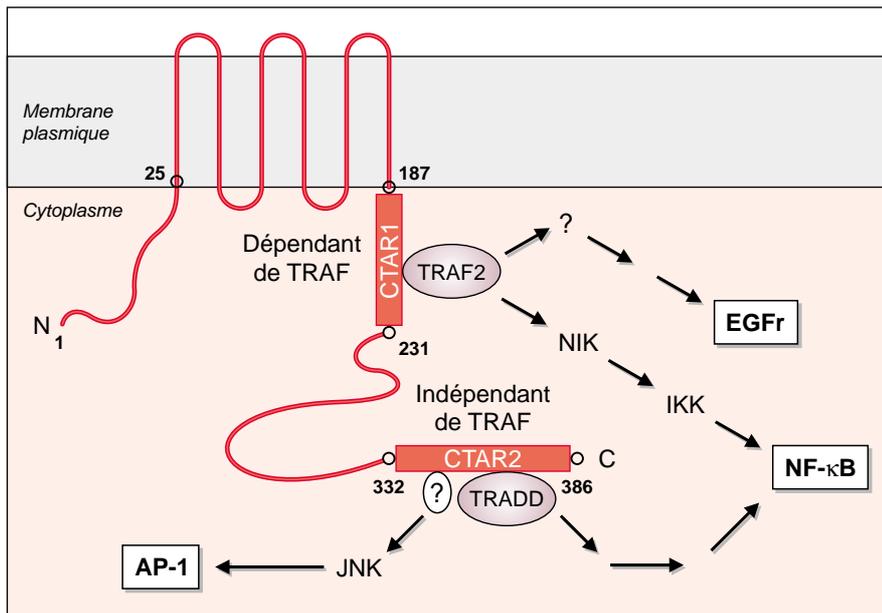


Figure 3. **Voies d'activation cellulaire induites par la protéine virale LMP1.** Dans la région carboxy-terminale de LMP1, deux régions (CTAR1 et CTAR2) sont importantes pour l'activation du facteur de transcription NF-κB: la première est dépendante d'une fixation à des protéines TRAF (TNF receptors associated factors) et la seconde est dépendante de la fixation de TRADD (TNF receptors associated death domain). CTAR2 est également responsable de l'induction de AP-1. L'induction transcriptionnelle du récepteur de l'EGF (EGFr) dans les cellules épithéliales est dépendante de TRAF2 et indépendante de NF-κB.

tion de NF-κB dans des cellules épithéliales. De même, une toute nouvelle voie de transmission du signal activant le complexe AP-1 par l'intermédiaire de la kinase JNK a été mise en évidence en aval de CTAR2 [45]. Nos résultats s'inscrivent dans cette série de données mettant en doute la nécessité d'une activation de NF-κB par LMP1 dans le processus de transformation par l'EBV.

Dans leur ensemble, ces résultats démontrent clairement une participation directe du virus dans le processus de transformation des lymphocytes T et apportent un argument fort aux hypothèses d'implication de l'EBV dans l'apparition de certains lymphomes ou leucémies T lors desquels son génome a été détecté. Des travaux sont actuellement en cours pour déterminer plus précisément le rôle de certains gènes viraux dans la transformation des lymphocytes T. De plus, certains arguments indiquent que le virus serait un cofacteur du processus et que d'autres signaux

d'origine cellulaire seraient nécessaires pour assurer la tumorigénèse de ces cellules.

Il est donc possible d'obtenir des cellules T présentant certaines caractéristiques de transformation après leur infection par l'EBV. Il reste à démontrer que ce processus est bien associé à certaines pathologies tumorales ■

* **GLOSSAIRE** *

- ATLL** : adult T-cell leukemia/lymphoma.
- EBV** : virus d'Epstein-Barr.
- EBV-SH** : syndrome hémophagocytaire associé au virus d'Epstein-Barr.
- LCL** : lignées cellulaires lymphoblastoïdes.
- PBL** : peripheral blood lymphocytes.
- SLX** : syndrome lymphoprolifératif lié au chromosome X.
- TCR** : T-cell receptor.

RÉFÉRENCES

1. Marelle L, Rea D, Raphaël M. Le virus d'Epstein-Barr et les proliférations lymphoïdes. *Med Sci* 1993; 9: 693-700.
2. Epstein M, Achong B, Barr Y. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* 1964; 1: 702-3.
3. Kikuta H, Taguchi Y, Tormizawa K, Kojima K, Kawamura N, Ishizaka A, *et al.* Epstein-Barr virus genome-positive T lymphocytes in a boy with chronic active EBV infection associated with Kawasaki-like disease. *Nature* 1988; 333: 455-7.
4. Jones JF, Shurin S, Abramowsky C, Tubbs RR, Sciotto CG, Wahl R, Sands J, Gottman D, Katz BZ, Sklar J. T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA in patients with chronic Epstein-Barr virus infections. *N Engl J Med* 1988; 318: 733-41.
5. Imai S, Sugiura M, Oikawa O, Koizumi S, Hirao M, Kimura H, *et al.* Epstein-Barr virus (EBV)-carrying and expressing T-cell lines established from severe chronic active EBV infection. *Blood* 1996; 87: 1448-57.
6. Su IJ, Chen RL, Lin DT, Lin KS, Chen CC. Epstein-Barr virus infects T lymphocytes in childhood EBV-associated haemophagocytic syndrome in Taiwan. *Am J Pathol* 1994; 144: 1219-25.
7. Kawaguchi H, Miyashita T, Herbst H, Niedobitek G, Asada M, *et al.* Epstein-Barr virus-infected T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated haemophagocytic syndrome. *J Clin Invest* 1993; 92: 1444-50.
8. Chan LC, Srivastava G, Pittagula S, Kwong YL, Liu HW, Yuen HL. Detection of clonal Epstein-Barr virus in malignant proliferation of peripheral blood CD3⁺ CD8⁺ T cells. *Leukaemia* 1992; 6: 952-6.
9. Craig FE, Clare CN, Sklar JL, Banks PM. T cell lymphoma and the virus associated haemophagocytic syndrome. *Am J Clin Path* 1992; 97: 189-94.
10. Gaillard F, Mechinaud-Lacroix F, Papin S, Moreau A, Mollat C, *et al.* Primary Epstein-Barr virus infection with clonal T-cell lymphoproliferation. *Am J Clin Path* 1992; 98: 324-33.
11. Harabuchi Y, Yamanaka N, Kataura A, Imai S, Kinoshita T, Mizuno F, Osato T, *et al.* Epstein-Barr virus in nasal T-cell lymphomas in patients with lethal mid-line granuloma. *Lancet* 1990; 335: 128-30.
12. Pallesen G, Hamilton-Dutoit SJ, Shou X. The association of Epstein-Barr virus (EBV) with T cell lymphoproliferations and Hodgkin's disease: two new developments in the EBV field. *Adv Cancer Res* 1993; 62: 179-239.
13. Su IJ, Hsieh HC, Lin KH, Uen WC, Kao CL, Chen CJ, Cheng AL, Kadin ME, Chen JY. Aggressive peripheral T-cell lymphomas containing Epstein-Barr viral DNA. A clinicopathological and molecular analysis. *Blood* 1991; 77: 799-808.
14. Zhou XG, Hamilton-Dutoit SJ, Yan QH, Pallesen G. High frequency of Epstein-Barr virus in Chinese peripheral T cell lymphoma. *Histopathology* 1994; 24: 115-22.

RÉFÉRENCES

15. De Bruin PC, Jiwa M, Oudejans JJ, van der Valk P, van Heerde P, Sabourin JC, *et al*. Presence of Epstein-Barr virus in extranodal T-cell lymphomas: differences in relation to site. *Blood* 1994; 83: 1612-8.
16. Meijer CJ, Jiwa NM, Dukers DF, Oudejans JJ, de Bruin PC, Walboomers JM, van den Brule AJ. Epstein-Barr virus and human T-cell lymphomas. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 191-6.
17. Chiang AK, Chan AC, Srivastava G, Ho FC. Nasal T/natural killer (NK)-cell lymphomas are derived from Epstein-Barr virus-infected cytotoxic lymphocytes of both NK- and T-cell lineage. *Int J Cancer* 1997; 73: 332-8.
18. Minarovits J, Hu LF, Imai S, Harabuchi Y, Kataura A, *et al*. Clonality, expression and methylation patterns of the Epstein-Barr virus genomes in lethal midline granulomas classified as peripheral angiocentric T cell lymphomas. *J Gen Virol* 1994; 75: 77-84.
19. d'Amore F, Johansen P, Houmand A, Weisenburger DD, Mortensen LS. Epstein-Barr virus genome in non-Hodgkin's lymphomas occurring in immunocompetent patients: highest prevalence in nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis. *Blood* 1996; 87: 1045-55.
20. Chen CL, Sadler RH, Walling DM, Su JJ, Hsieh HC, Raab-Traub N. Epstein-Barr virus (EBV) gene expression in EBV-positive peripheral T cell lymphomas. *J Virol* 1993; 67: 6303-8.
21. Suzushima H, Asou N, Fujimoto T, Nishimura S, Okubo T, Yamasaki H. Lack of the expression of EBNA-2 and LMP-1 in T-cell neoplasms possessing Epstein-Barr virus. *Blood* 1995; 85: 480-6.
22. Wen S, Mizugaki Y, Shinozaki F, Takada K. Epstein-Barr virus (EBV) infection in salivary gland tumors: lytic EBV infection in nonmalignant epithelial cells surrounded by EBV-positive T-lymphoma cells. *Virology* 1997; 227: 484-7.
23. Thomas JA, Cotter F, Hanby AM, Long LQ, Morgan PR, Bramble B, Bailey BM. Epstein-Barr virus-related oral T-cell lymphoma associated with human immunodeficiency virus immunosuppression. *Blood* 1993; 81: 3350-6.
24. Tokunaga M, Imai S, Uemura M, Tokudome T, Osato T, Sato E. Epstein-Barr virus in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 1263-9.
25. Toben HR, Smith RG. T lymphocytes bearing complement receptors in a patient with chronic lymphocytic leukaemia. *Clin Exp Immunol* 1977; 27: 292-302.
26. Fischer E, Delibrias C, Kazatchkine MD. Expression of CR2 (the C3dg/EBV receptor, CD 21) on normal human peripheral blood T lymphocytes. *J Immunol* 1991; 146: 865-9.
27. Tsoukas CD, Lambris JD. Expression of CR2/EBV receptors on human thymocytes detected by monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1229-302.
28. Watry D, Hedrick JA, Siervo S, Rhodes G, Lamberti JJ, Lambris JD, Tsoukas CD. Infection of human thymocytes by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 1991; 173: 971-80.
29. Fingerth JD, Clabby ML, Strominger JD. Characterization of a T-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor (CD21). *J Virol* 1988; 62: 1442-7.
30. Yoshiyama H, Imai S, Shimizu N, Takada K. Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 1997; 71: 5688-91.
31. Kelleher CA, Kaufman Paterson R, Dreyfus DH, Streib JE, Wu JW, Takase K, Jones JF, Gelfand EW. Epstein-Barr virus replicative gene transcription during *de novo* infection of human thymocytes: simultaneous early expression of BZLF-1 and its repressor RA ζ . *Virology* 1995; 208: 685-95.
32. Kaufman Paterson RL, Kelleher CA, Streib JE, Amankonah TD, Wu XJ, Jones JF, Gelfand EW. Activation of human thymocytes after infection by EBV. *J Immunol* 1995; 154: 1440-9.
33. Guan M, Zhang RD, Wu B, Henderson EE. Infection of primary CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes by Epstein-Barr virus enhances human immunodeficiency virus expression. *J Virol* 1996; 70: 7341-6.
34. Raphaël M, Eclache V, Martin A, Feuillard J. Les lymphomes du SIDA. *Med Sci* 1995; 11: 713-22.
35. Hedrick JA, Watry D, Speiser C, O'Donnell P, Lambris JD, Tsoukas CD. Interaction between Epstein-Barr virus and a T cell line (HSB-2) *via* a receptor phenotypically distinct from complement receptor type 2. *Eur J Immunol* 1992; 22: 1123-31.
36. Shapiro IM, Volsky DJ, Saemundsen AK. Infection of the human T-cell-derived leukemia line Molt-4 by Epstein-Barr virus (EBV): induction of EBV-determined antigens and virus reproduction. *Virology* 1982; 120: 171-81.
37. Fujiwara S, Ono Y. Isolation of Epstein-Barr virus-infected clones of the human T-cell line MT-2: use of recombinant viruses with a positive selection marker. *J Virol* 1995; 69: 3900-3.
38. Yoshiyama H, Shimizu N, Takada K. Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *EMBO J* 1995; 14: 3706-11.
39. Peng M, Lundgren E. Transient expression of the Epstein-Barr virus LMP1 gene in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells, T cells, and hematopoietic cell lines: cell-type-independent-induction of CD23, CD21, and ICAM-1. *Leukemia* 1993; 7: 104-12.
40. Kawanishi M. Expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects Jurkat T cells from apoptosis induced by serum deprivation. *Virology* 1997; 228: 244-50.
41. Stevenson M, Volsky B, Hedenskog M, Volsky DJ. Immortalization of human T lymphocytes after transfection of Epstein-Barr virus DNA. *Science* 1986; 233: 980-4.
42. Groux H, Cottrez F, Montpellier C, Quattanens B, Coll J, Stéhelin D, Auriault C. Isolation and characterization of transformed human T-cell lines infected by Epstein-Barr virus. *Blood* 1997; 89: 4521-30.
43. Montpellier C, Crepieux P, Quattanens B, Delobel B, Croquette MF, Stéhelin D, Auriault C, Groux H, Coll J. Homologous T and B cells immortalized *in vitro* by the Epstein-Barr virus exhibit differential genetical and functional features. *Int J Oncol* 1997; 11: 87-96.
44. Stancovski I, Baltimore D. NF- κ B activation: the I κ B kinase revealed? *Cell* 1997; 91: 299-302.
45. Kieser A, Kilger E, Gires O, Ueffing M, Kolch W, Hammerschmidt W. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity *via* the c-Jun N-terminal kinase cascade. *EMBO J* 1997; 16: 6478-85.

Summary

In vivo and *in vitro* Epstein-Barr virus associated lymphoproliferative disorders

Since its discovery in cultured lymphoblasts from African Burkitt's lymphoma in 1964, the Epstein-Barr virus or EBV has been associated to various types of malignancies such as infectious mononucleosis, nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin's disease. It has been shown that the EBV is associated to B lymphocytes in lymphoproliferative disorders. It also appears to be linked, however, to a variety of non-Hodgkin's T lymphomas and T leukemias. Lymphoblastoid cell lines (or LCLs) are readily established by EBV infection *in vitro* but we have shown that it was also possible to transform peripheral T-cells *in vitro* after EBV infection. In these naive T-cell lines, the two EBV genes *EBNA 1* and *LMP1* are both expressed which is a characteristic of most of the EBV-associated T malignancies. The study of these transformed T-cells could be very useful for understanding the involvement of EBV in T lymphoproliferative disorders.

TIRÉS À PART

J. Coll.