



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE



Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Biologie Animale

قسم : بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : *Génétique Moléculaire*

Intitulé :

Implication du virus d'Epstein-Barr dans le développement des lymphomes (l'exemple du lymphome de Burkitt)

Présenté et soutenu par : *KARA-MOSTEFA Aymen*
KHODJA Moustafa

Le : 19/06/2016

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila* (PROF - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineur : *FERTOUL-GHARZOULI Razika* (MC.B - UFM Constantine).

Année universitaire
2015 - 2016

En tout premier lieu, nous remercions le bon Dieu

ALLAH, tout puissant, de nous avoir donné le
courage et la force pour réaliser ce travail, ainsi que

l'audace et la volonté pour dépasser toutes les

difficultés.

Remerciements

Tous nos remerciements vont, tout d'abord à notre encadreur,
Monsieur REZGOUNE Mohamed Larbi, enseignant-chercheur à la faculté des sciences de la nature et la vie de
l'Université des frères Mentouri Constantine. Sa patience, ses encouragements, sa rigueur, sa compétence et
son expérience scientifique ont contribué énormément à notre formation et à l'aboutissement
De ce travail de recherche.

Qu'il trouve ici l'expression de notre estime et notre éternelle reconnaissance.

Un grand merci enfin pour sa sympathie.

Nous tenons à exprimer nos remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail.

On remercie sincèrement Madame SATTAD, professeur à l'université des frères Mentouri Constantine qui
nous fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire et également pour son soutien et ses conseils le long de
notre parcours académique.

On remercie chaleureusement madame FERTOUL-GHARZOULI Razika
Docteur à la faculté des sciences de la nature et la vie pour sa présence En tant qu'examinatrice
Aux seins de ce jury et son implication Avec nous durant nos années d'études.

Nous remercions tous ceux, qui, à des degrés divers, nous ont aidés de près ou de loin à l'élaboration de ce
travail. Nous exprimons notre profonde gratitude pour leur gentillesse, leur amabilité et leur disponibilité et
j'en passe. On cite parmi eux :

Tous les enseignants des parcours Licence Génétique et Master Génétique Moléculaire.

Messieurs KHMISSI M, ZOUITEN R et MADOUID médecins en chef à l'hôpital militaire de Constantine sans
qui la réalisation de la partie pratique n'aurait pas été possible.

Tout le personnel du laboratoire de la microbiologie de l'hôpital militaire Constantine.

Tous nos collègues et ami(e)s pour leur compagnie et leur soutien tout au long de notre formation.
Pour tous ceux que j'ai oubliés de mentionner, merci pour les belles années passées avec vous un GRAND
merci à tous.

Abréviations

ACVBP : Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine, Prednisone
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
AICDA : Activation-Induced Cytidine Deaminase
AP-1 : Activator Protein 1
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ARNm : ARN messenger
ARNs : Short ARN
ATF-2 : Activating transcription factor 2
BART : *BamHI*-A Rightward Transcripts
bcl-6 : B-cell lymphoma 6
BCR : B Cell Receptor
b-zip : basic leucine zipper
CBF-1 : Cp Binding Protein
CD44v3 : CD44 variant 3
CDK : Cycline Dependent Kinase
CDKI : CDK Inhibitor
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV : Cyto-Mégalo-Virus
CNP : Carcinome indifférencié du Naso-Pharynx
CRP : Carcinome du Rhino-Pharynx
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CTAR : C-Terminal Activating Region
DO : Densité Optique
EA : Early Antigen
EBER : EBV Encoded RNA
EBNA2 : EBV Nuclear Antigen 2
EBV : Epstein-Barr Virus
ED-L1 : *EcoRI* D fragment-located LMP1 promoter
ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FC : Facteur de Correction
Gly-Ala : Glycine-Alanine
HHV : Human Herpes Virus
HIS : Hybridation *In Situ*
HSV1 : Virus Herpès Simplex de types 1
ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1
IF : Immuno-Fluorescence
IFN- α : Interféron α
IgA : Immunoglobulines A
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
IL : Interleukine 10
IR1 : Internal Repeat 1
ISR : Immune Status Ratio
ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activator Motif
JAK3 : Janus Kinase 3
kDa : Kilo-Dalton
KSHV : Kaposi Sarcoma associated Herpes Virus
LB : Lymphome de Burkitt

LCL : Lymphoblastoïd Cell Line
LDH-A : Lactate DesHydrogenase A gène
LFA : Lymphocyte Function-associated Antigen
LH : lymphomes hodgkiniens
LMNH : Lymphome Malin Non-Hodgkinien
LMP : Latent Membrane Protein
LPB : Lympho-Proliférative B
MDM2 : Murine Double Minute 2
miARN : micro ARN
MNI : MonoNucléose Infectieuse
NF-κB : Nuclear Factor-kappa B
OMS : Organisation mondiale de la Santé
ORF : Open Reading Frame
PBD : *Paul-Bunnell-Davidsohn*
PCAF : P300/CBP-Associated Factor
PCR : Polymerase Chain Reaction
PKR : Protein Kinase R
PTK : Protéine Tyrosine Kinase
RAG1/2 : Recombination Activation Gene
RBP-Jk : Recombination Signal Binding Protein 1 for J Kappa
RS : Reed-Sternberg
SCID : Severe Combined Immuno-Defeciency
shARN : short ARN
SLPT : Syndrome Lympho-Prolifératif Post-Transplantation
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
T/NK : Natural killer T
TBP : TATA-box Binding Protein
TERT : TElomerase Reverse Transcriptase
TFIIB : Transcription Factor II B
TNF : Tumor Necrosis Factor
TR : Terminal Repeat
TRAFs : TNF Related Associated Factor
TRAP1 : TNF Receptor Associated Protein 1
TR-L1 : Terminal Repeat-located LMP1 promoter
UL : Long Unique region
US : Short Unique region
VIH : Virus de l'Immunodéficiency Humaine
VS : Valeur-Seuil du calibreur
VZV : Virus de la Varicelle et du Zona

Table des matières

Introduction

Page 1

Partie bibliographique

Chapitre I : le virus de l'EBV

1 - Historique (découverte)	3
2 - Taxonomie	3
3 - Données épidémiologiques	4
4 - Structure du virus	5
5 - Le génome de l'EBV	6
6 - Les protéines virales	9
6- 1 -Protéines de latence vs protéines du cycle lytique	9
6 -1 -1 -Les protéines nucléaires (la famille des EBNA)	10
a - EBNA1	12
b - EBNA2 et EBNA-LP	13
c - Les EBNA3	14
6 -1 -2 -. La famille des LMPs (Les protéines membranaires)	14
a - LMP1	15
b - LMP2	15
6 -1 - 3- Les ARN viraux non codants	16
a - EBER 1 et EBER 2	16
b - Les ARN BART et les micros ARN viraux	17
7 - Biologie de l'infection par l'EBV	18
8 - Cycle viral	21
8 - 1 - Les voies de contamination	21
8 - 2 - Entrée du virus dans ses cellules cibles	21
8 - 2 - 1 - Entrée du Virus dans les Lymphocytes B	21
8 - 2 - 2 - Entrée du Virus dans les cellules épithéliales	22
8 - 3 - Établissement d'une infection latente	24
8 - 4 - Persistance virale	25
8 - 5 - Réplication virale	26
8 - 5 - 1 - Les gènes immédiats précoces	27
8 - 5 - 2 - Les gènes précoces	27
8 - 5 - 3 - Les gènes tardifs	28
9 - Mécanismes de défense immunitaire	29
9 - 1 - Réponse innée	29
9 - 2- Réponse adaptative	30
10 - Principales pathologies associées à EBV	31
10 - 1- Infection primaire et pathologies	31
10 - 2 -Infection persistante et pathologies tumorales	31
10 - 2 - 1 - Le Carcinome du cavum	31
10 - 2 - 2 - Le Lymphome de Burkitt	31
10 - 2 - 3 - Le Lymphome de Hodgkin	32
10 - 2 - 4 - Syndrome Lymphoprolifératif Post-Transplantation (SLPT).....	32
10 - 2 - 5 - Autres cancers	32
10 - 3 - EBV et pathologies auto-immunes	33

11 - Diagnostic biologique de l'infection par l'EBV	33
11 - 1- Tests sérologiques (détection des anticorps)	33
11 - 2 - Diagnostic moléculaire	35
11 - 3 -Mise en évidence du virus	35

Chapitre II : le lymphome de Burkitt

1 - Définition et classifications	36
2 - Épidémiologie	38
3 - Physiopathologie du lymphome de Burkitt	39
3 - 1 - Le facteur de transcription <i>C-MYC</i> et EBV.....	39
3 - 2 - Réarrangements de <i>C-MYC</i>	42
4 - Diagnostic	43
5 - Pronostic et traitement	44

Partie pratique

Techniques de diagnostic biologique de l'EBV

I- Le test EBV-EA IgG ELISA	46
1- Objectif	46
2- Principe du test	46
3- Composition de la trousse	47
4- Matériel nécessaire	48
5- Reconstitution des réactifs, validité et conservation	49
6- Dépôt des échantillons à analyser	49
7- Mode opératoire	50
8- Calcul et interprétation des résultats	53
	55
II- Le test MNI FUMOUCHE® (diagnostic immunologique de la MNI)	55
1- Objectif	55
2- Principe	55
3- Composition du coffret	55
4- Matériel nécessaire	55
5- Recueil, préparation et conservation des échantillons	55
6- Mode opératoire	56
7- Interprétation des résultats	56
Discussion	57
Conclusion et perspectives	62
Références bibliographiques	63

Annexes

Résumés

Liste des figures

Figure 01 : Structure du virus EBV	6
02 : Représentation schématique du génome d'EBV	7
03 : Expression du génome EBV.....	8
04 : Représentation schématique de l'épissage alternative à l'exon W1/W1'.....	11
05 : Représentation schématique des étapes précoces de l'infection par l'EBV	19
06 : Modèle de l'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV.....	23
07 : Schématisation de la façon dont EBV utilise la biologie des cellules B	25
08 : productif de l'EBV dans les cellules <i>in vitro</i>	26
09 : Aspect cytologique du lymphome de Burkitt	37
10 : Aspect cytogénétique du lymphome de Burkitt	37
11 : Épidémiologie du lymphome de Burkitt : distribution géographique	38
12 : Activité transcriptionnelle de C-MYC.....	40
13 : Mécanismes moléculaire de la lymphomagenèse.....	41
14 : Localisation des points de cassure sur le gène <i>C-MYC</i> et sur les loci <i>IG</i> lors du lymphome de Burkitt chez l'homme	43
15 : Composition de la trousse du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIORAD).....	48
16 : Organisation de la plaque du test EBV-EA IgG ELISA et disposition des réactifs utilisés.	50
17 : Préparation de la plaque du test EBV-EA IgG ELISA.....	52
18 : Calcul de la moyenne des absorbances du test EBV-EA IgG ELISA.....	53
19 : Interprétation des résultats du test MNI FUMOUCHE®	56

Liste des tableaux

Tableau I : Programmes de latence de l'EBV et les patrons d'expression les caractérisant	20
II : Stadification de <i>Murphy</i> des lymphomes de Burkitt.....	45
III : Composition de la trousse du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIO-RAD)	47
IV : Valeurs d'interprétation du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIO-RAD).....	54

Le cancer est la première cause de mortalité de par le monde, il reste une maladie multi-factorielle où plusieurs événements peuvent être incriminés. L'étiologie demeure, en grande partie, inconnue. Les facteurs étiologiques reconnus sont génétiques endogènes (constitutionnels) ou environnementaux (pollution industrielle, rayonnements UV et alimentation). Parmi ces facteurs bien établis, certaines infections virales occupent une place prépondérante **(Dang, 2012)**.

Plusieurs virus humains sont directement ou indirectement associés à des cancers. Les virus oncogènes directs les mieux établis aujourd'hui appartiennent à quatre familles. On distingue les herpes virus avec le virus d'Epstein Barr (EBV) et le virus du sarcome de Kaposi, les papillomavirus, le virus de l'hépatite B et le rétrovirus HTLV1. Certains de ces virus sont relativement endémiques et dans pratiquement tous les cas nécessitent l'intervention de cofacteurs ou d'éléments prédisposant pour donner lieu à une prolifération tumorale. Le rôle de l'environnement est particulièrement souligné dans des pathologies comme le lymphome de Burkitt, le carcinome du naso-pharynx, la leucémie/lymphome T de l'adulte associée à HTLV1 et le carcinome hépatocellulaire sur foie sain en zone endémique. Plusieurs équipes travaillent sur les caractères oncogènes de ces virus. Ces virus représentent un véritable enjeu de santé publique et la prise en charge du risque fait varier l'incidence des cancers associés en fonction des pays **(Vita et Henriksson, 2006)**.

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est un gammaherpèsvirus humain qui infecte, généralement de façon asymptomatique, plus de 90% de la population. Cependant, ce virus est associé à de nombreuses pathologies malignes telles que des lymphomes T, les lymphomes hodgkiniens, des carcinomes gastriques et les carcinomes du rhinopharynx. Dans la majorité des cancers associés à ce virus, il exprime un programme de latence de type II durant lequel la protéine LMP1 (latent membrane protein 1) est exprimée. Elle est décrite comme l'oncogène majeur de l'EBV, et fait l'objet d'études pour le développement d'approches thérapeutiques.

Comme tous les herpesviridae, le virus EBV peut exister sous 2 formes : une forme latente qui permet sa persistance dans l'organisme et une forme lytique qui assure sa réplication. L'équilibre entre ces deux états est un paramètre fondamental de la biologie du virus mais les mécanismes en sont encore mal maîtrisés. De plus, aucun anti-viral disponible à ce jour n'est réellement efficace en prévention ou en traitement de ces pathologies **(Young et Rickinson, 2004)**.

L'objectif de ce mémoire de Master est de faire, tout d'abord, une revue bibliographique bien documentée et actualisée sur l'EBV et lymphome de Burkitt que nous avons divisé en deux grands chapitres :

- Le premier chapitre concerne la biologie de l'EBV, plus particulièrement centrée sur sa génétique, son cycle lytique et l'impact de cette réplication virale dans les pathologies associées à EBV.
- Le deuxième se focalise sur l'aspect physiopathologique du lymphome de Burkitt et plus particulièrement les mécanismes moléculaires de la lymphomagenèse médiée par l'EBV.

Dans la partie pratique de ce mémoire, nous avons essayé d'apprendre et d'appliquer les techniques de diagnostic biologique de l'EBV utilisées au niveau de l'hôpital militaire - Constantine.

Partie
bibliographique

Chapitre I

Le virus de l'EBV

1- Historique (découverte) :

En 1958, *Denis Burkitt*, chirurgien anglais, décrit une tumeur du maxillaire supérieur chez les enfants africains en rapport avec une prolifération de lymphocytes B (**Burkitt, 1958**). Cette entité pathologique, dite Lymphome de Burkitt (LB), représente alors la tumeur la plus fréquente chez ces enfants dans certaines régions d'Afrique de l'Est. C'est en 1961, en assistant à une conférence de *Denis Burkitt* sur ce lymphome africain qui se répartit selon des facteurs géographiques et climatiques faisant suspecter une influence virale, qu'*Anthony Epstein* décide de rechercher ce possible virus. En 1964, l'établissement de lignées cellulaires à partir d'explants de LB permet à *Epstein, Yvonne Barr* et *Bert Achong* d'identifier des particules de type herpèsvirus par microscopie électronique dans ces lignées cultivées *in vitro* (**Epstein et al., 1964**). Ces virus, morphologiquement similaires aux herpesvirus connus à cette époque, étaient en fait complètement différents du point de vue biologique et antigénique. Le premier gamma-herpesvirus humain, l'Epstein-Barr Virus (EBV), fut ainsi découvert dans des LB. En 1968, des études séro-épidémiologiques démontrèrent que l'EBV infecte plus de 95 % de la population et qu'il constitue l'agent étiologique d'une maladie anciennement connue, la mononucléose infectieuse (**Henle et al., 1968**).

À partir de 1970, on détecte le génome viral dans les cellules malignes du LB et du Carcinome indifférencié du Naso-Pharynx (CNP), ce qui confirme l'association de ce virus à des cancers chez l'homme. Sa capacité à immortaliser les lymphocytes B *in vitro* en lignées cellulaires lymphoblastoïdes et à provoquer des lymphomes chez le primate est alors démontrée et conforte l'EBV dans son rôle d'agent oncogène chez l'homme (**Henle et al., 1970**).

Depuis lors, l'EBV a été impliqué dans de nombreuses pathologies bénignes ou malignes d'origine épithéliale ou lymphoïde. En 1984, l'EBV est le premier virus humain dont le génome est entièrement séquencé (**Baer et al., 1984**).

2- Taxonomie :

Le Virus Herpes 4 (HHV4 (Human Herpes Virus 4)), communément appelé Virus Epstein-Barr ou EBV, appartient au genre *lymphocryptovirus*, la famille des *Herpesviridae* (regroupant plus de 100 virus connus, infectant aussi bien les animaux que les êtres humains), la sous-famille des *gamma-herpèsviridae* (infectant exclusivement les humains).

À ce jour, huit Herpesvirus humains ont été découverts. Il s'agit des deux Virus Herpès Simplex de types 1 et 2 (HSV1 et HSV2), du Virus de la Varicelle et du Zona (VZV), du Cyto-Mégalo-Virus (CMV), de l'EBV et des Herpes virus HHV6, HHV7 et HHV8 (ou KSHV (Kaposi Sarcoma associated Herpes Virus)).

Les Herpesvirus sont classées en trois sous-familles α , β , et γ , en fonction de leurs propriétés biologiques telles que le tropisme cellulaire *in vivo*, les caractéristiques de culture *in vitro*, la vitesse de réplication du génome viral, ainsi que la taille et la structure de ce dernier. Les γ -Herpesvirus ont un spectre d'hôte étroit. Ils ont un cycle réplicatif long, une latence principalement dans les lymphocytes B et un grand pouvoir oncogène (**Rickinson et Kieff, 2007**).

Les différentes souches d'EBV peuvent être classées en 2 types (EBV-1 et EBV-2) sur la base du polymorphisme de leurs gènes EBNA2 (EBV Nuclear Antigen 2), 3A, 3B et 3C. Des études de séroprévalence ont montré que la souche EBV-1 est majoritaire dans les pays occidentaux, alors que la souche EBV-2 ne prévaut que dans certaines zones d'Afrique Équatoriale et de Nouvelle-Guinée. De plus, une micro-hétérogénéité supplémentaire existe parmi ces deux souches, notamment dans les régions répétées du génome viral, donnant ainsi de nombreux isolats différents (**Grunewald et al., 1998**).

3- Données épidémiologiques :

L'EBV est présent dans plus de 95 % de la population adulte. Le virus est véhiculé durant toute la vie, par l'intermédiaire d'une infection latente des lymphocytes B et d'une production virale dans la salive. La majorité des primo-infections touchent les enfants et sont généralement asymptomatiques. Cependant, lorsque la primo-infection a lieu plus tard, chez l'adolescent elle induit une affection généralement bénigne, la mononucléose infectieuse. Il s'agit d'une maladie Lympho-Proliférative B (LPB) généralisée et transitoire, qui se traduit sur le plan immunologique par une augmentation du nombre de lymphocytes B infectés par l'EBV dans le sang périphérique et par une expansion oligo-clonale massive de lymphocytes T CD8+ dirigés contre l'EBV. Le virus persiste ensuite dans l'organisme pendant toute la vie, à l'état latent dans des lymphocytes B, mais aussi sous forme de particules virales infectieuses excrétées au niveau de l'oropharynx et dans la salive. Cette réactivation virale, intermittente chez le sujet immunocompétent, est accrue grandement lors des états d'immunodépression (**Clave et al., 2004**).

La transmission du virus se fait généralement par contact avec les sécrétions oropharyngées qui contiennent les particules virales infectieuses. La transmission est également possible après transplantation d'organes ou greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH) via les lymphocytes B infectés par l'EBV présents dans le sang des donneurs. Cette infection constitue un facteur de risque de syndrome lymphoprolifératif post-transplantation. Toutefois, à la différence des lymphomes survenant après greffe de CSH, les cellules tumorales des lymphomes post-transplantation d'organe dérivent en général des cellules B du receveur (**Orazi et al., 1997 ; Paya et Fung, 1999**).

4- Structure du virus :

La structure générale de l'EBV est celle des herpesvirus ; il est à noter que tous ces virus possèdent une morphologie identique et ne peuvent être distingués l'un de l'autre sous microscopie électronique (**figure 1**). La structure du virus comporte, de l'intérieur vers l'extérieur, un nucléoïde, une capsid, un tégment et une enveloppe :

- **Le nucléoïde** est constitué d'un ADN bicaténaire, linéaire, enroulée autour d'une structure protéique. L'existence d'un cœur protéique fibrillaire autour duquel serait enroulé l'ADN viral est largement remise en cause pour de nombreux herpesvirus comme HSV1, HCMV et KSHV.
- **La capsid** qui est de forme icosaédrique (20 faces et 12 sommets) mesure 100 à 120 nm de diamètre et comporte 162 capsomères (150 hexamères et 12 pentamères). Cette capsid icosaédrique recouvrant le nucléoïde est-elle même entourée d'un ensemble fibrillaire asymétrique : le tégment.
- **Le tégment** qui est composé de nombreuses protéines virales et cellulaires différentes dont β -actine, cofiline, tubuline, Hsp90 et Hsp70. Ce tégment n'a pas de structure particulière, même si quelques structures fibrillaires peuvent y être retrouvées.
- **L'enveloppe**, enfin, constituée d'un double feuillet lipidique dérivé des membranes de la cellule hôte au niveau desquelles le virus a exprimé ses antigènes de membrane. L'expression des glycoprotéines d'enveloppe, qui appartiennent aux antigènes de membrane, confère au virion un aspect "spiculé". C'est grâce à l'une d'entre-elles, la gp350/220 que le virus se fixe aux cellules hôtes via son récepteur CD21 (ou CR2, récepteur d'un composant du complément). Comme pour la plupart des virus enveloppés, la double couche lipidique est l'élément de fragilité du virus et toute altération, que ce soit par l'utilisation de détergent, de solvant ou même par la chaleur, atténue l'infectivité du virus (**Young et al., 2004**).

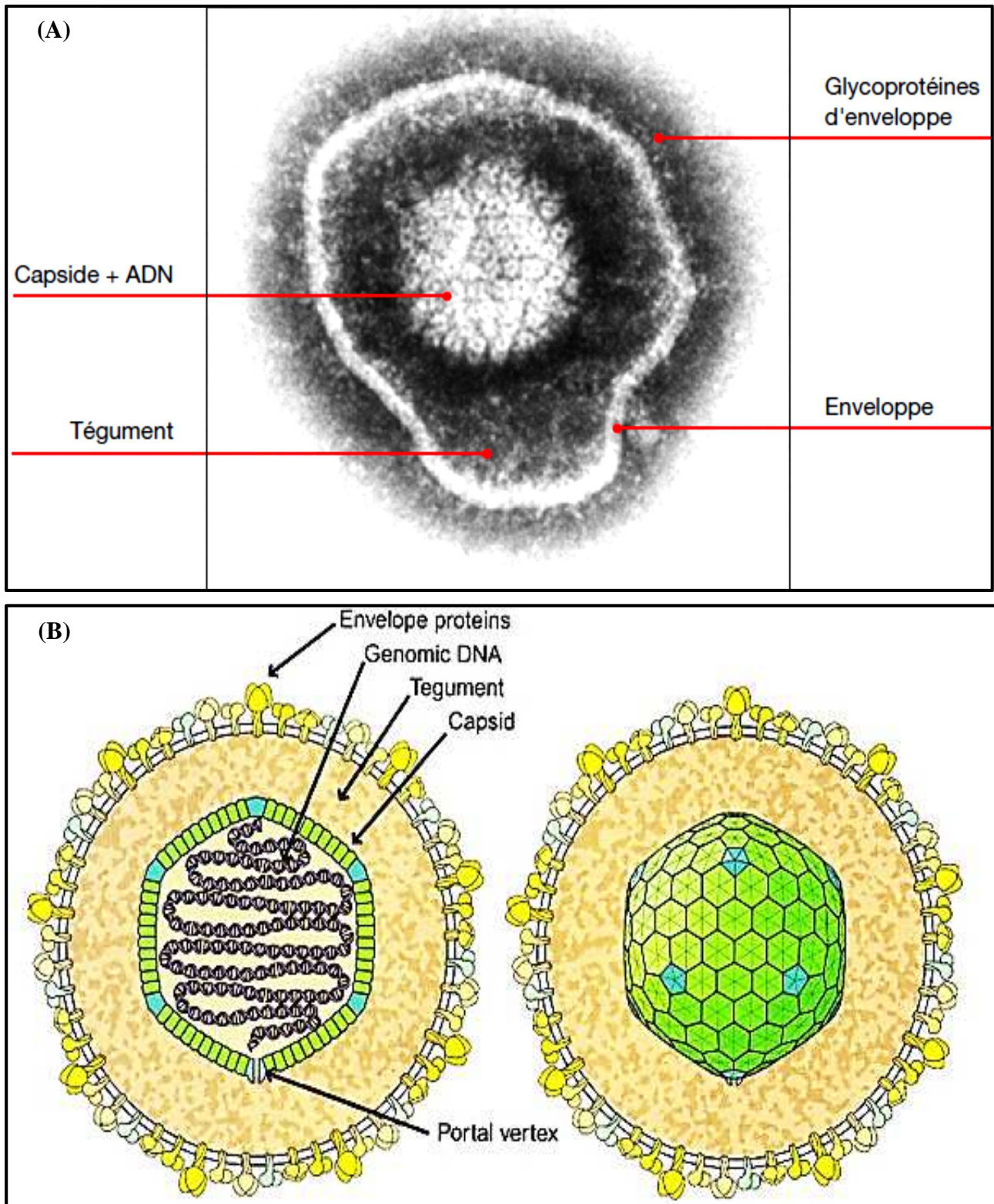


Figure 1 : Structure du virus EBV.

(A) en microscopie électronique (coloration négative) et (B) représentation schématique (d'après Seigneurin et al., 2009).

5- Le génome de l'EBV :

En 1984, le génome d'EBV a été entièrement séquencé à partir de la souche B95-8, souche provenant d'une lignée lymphoïde infectée par EBV (Baer *et al.*, 1984).

Le génome de l'EBV se présente sous la forme d'un ADN double brin d'environ 172 kb. Il est constitué de deux domaines uniques : un domaine court de 15000 pb (US, Short Unique region), et un domaine long de 150000 pb (UL, Long Unique region). Ces deux domaines sont séparés par des séquences répétées en tandem de 3071 pb constituant la région répétée interne 1 (IR1, Internal Repeat 1). Dans le domaine UL, il existe trois autres séquences répétées internes, IR2, IR3 et IR4, qui divisent le domaine UL en quatre domaines uniques U1, U2, U3 et U4. Le génome viral, sous forme linéaire dans la particule virale, est flanqué à ses deux extrémités de deux séquences répétitives (TR, Terminal Repeat) constituées suivant les souches de 4 à 12 répétitions en tandem d'une séquence de 550 pb. La circularisation du virus en épisode dans le noyau cellulaire se fait grâce à la fusion de ces deux TR ; c'est sous cette forme épisomale que le virus persiste dans la cellule de manière latente. Pendant la phase de latence, l'EBV se réplique de façon synchrone avec la cellule infectée lors de la phase S du cycle cellulaire, en utilisant l'origine de réplication latente : Ori-P. À proximité des régions IR2 et IR4, existent deux régions homologues nommées DR et DL, ayant la même orientation et composées de séquences répétitives. Ces séquences sont les deux origines de réplication lytique (Ori-Lyt) de l'EBV (figure 2) (Young *et al.*, 2004).

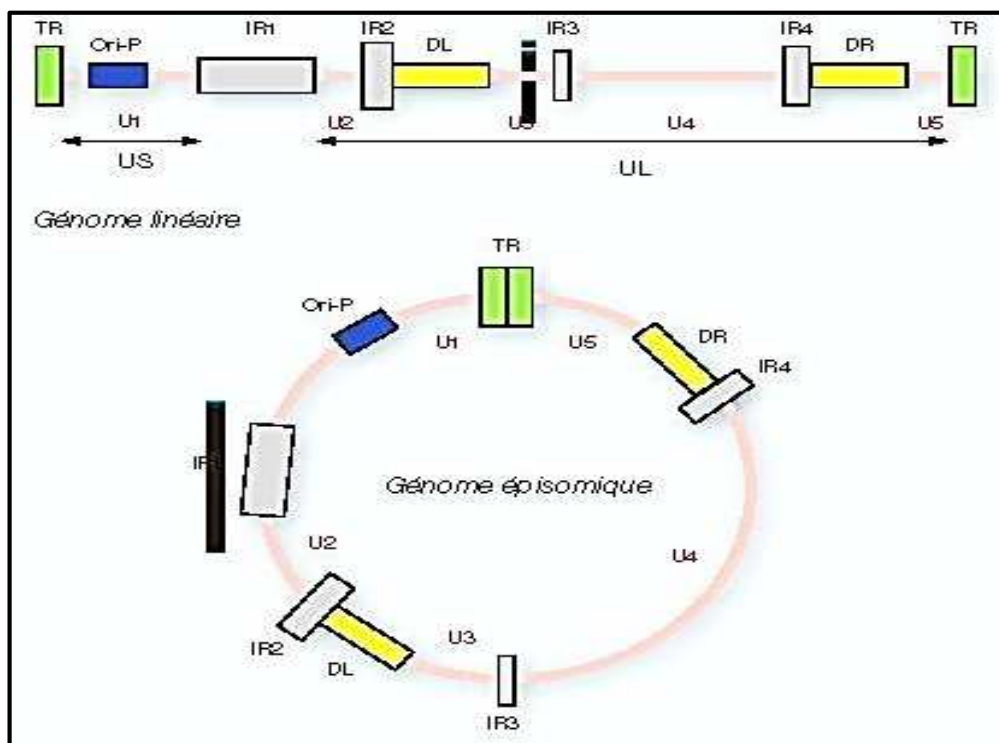


Figure 2 : Représentation schématique du génome d'EBV (d'après Young et Rickinson, 2004).

L'analyse de la séquence des clones obtenus par digestions avec *Bam*HI de la souche B95-8 a permis l'identification d'une centaine de cadres de lectures ouverts (Open Reading Frame (ORF)) désignés par leur ordre dans le sens de transcription droite ou gauche (Leftward ou Rightward) au sein de chaque fragment de *Bam*HI. Ainsi BARFI est le premier ORF du fragment Bam A dans le sens d'une transcription partant vers la droite (**figure 3**) (**voir annexe I**).

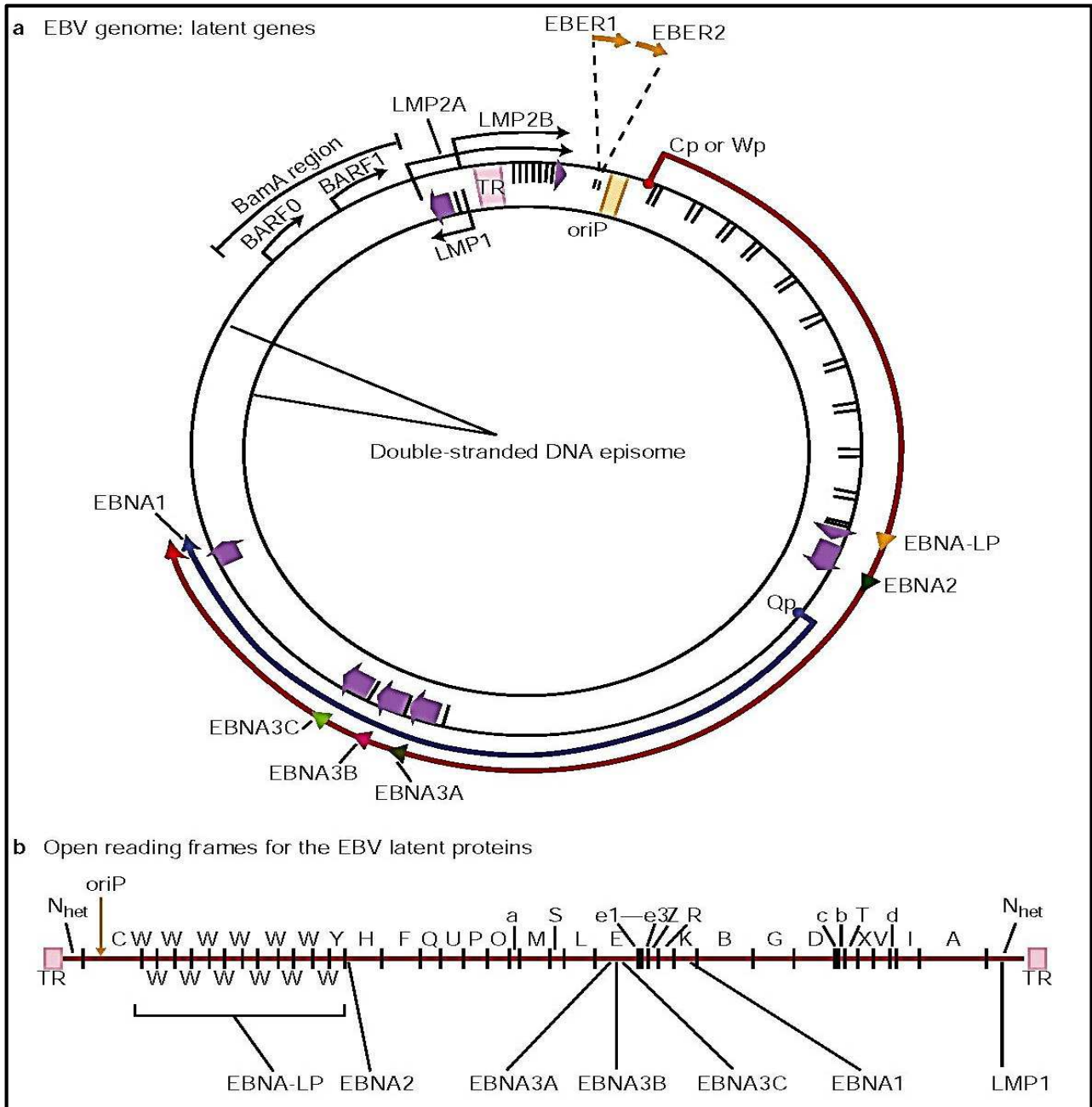


Figure 3 : Expression du génome EBV.

- (A) Expression des gènes de latence,
- (B) Cartographie des fragments de restriction par *Bam*HI du génome de la souche EBV B95-8 ainsi que des différentes ORF codants pour les protéines de latence (d'après Young et Rickinson, 2004).

Schématiquement, on distingue les gènes codant pour les protéines de latence et les gènes codant pour les protéines du cycle lytique. Les premières sont exprimées lors de l'infection dite latente, qui permet la persistance du virus dans la cellule, en absence de synthèse de nouvelles particules virales. Les protéines du cycle lytique sont principalement des protéines de structure et des enzymes de transcription et de réplication virale. Une centaine de gènes ont été décrits, dont au moins onze sont exprimés pendant la phase de latence. Ces gènes sont regroupés en 3 principales familles : six gènes nucléaires, deux gènes LMP (Latent Membrane Protein) et des gènes codant pour des petits ARN (**Hutt-Fletcher, 2007**).

6- Les protéines virales :

Le virus EBV peut exécuter deux programmes distincts d'expression génique. Le premier, lytique ou productif, correspond à l'expression en cascade des différentes protéines virales permettant la fabrication de nouveaux virions. Le second, appelé latence, n'aboutit pas à la production de virus mais permet la persistance virale dans les lymphocytes B avec une expression d'antigène viraux réduite.

L'ancienne distinction tranchée entre protéines de latence et protéines du cycle lytique a été récemment remise en cause par des études montrant que des gènes dits « lytiques » comme les homologues du facteur cellulaire anti-apoptotique Bcl2 (B-Cell Lymphoma 2) étaient exprimés et probablement nécessaires à la mise en place de la latence sans pour autant qu'il y ait production de particules virales (**Young et Rickinson, 2004**).

6-1- Protéines de latence vs protéines du cycle lytique :

L'infection latente dans les cellules B immortalisées par EBV est associée avec l'expression de :

➤ Les 6 gènes qui codent pour EBNA :

- **EBNA1** est requis pour la réplication épisomale et la maintenance du génome viral.
- **EBNA2** est essentiel au processus d'immortalisation des lymphocytes B et à l'expression des protéines EBNA-1 et EBNA-3. La variation d'expression des protéines EBNA-2 induit les variations biologiques les plus significatives entre deux types d'EBV. EBNA2 est un facteur de transcription qui stimule l'expression des LMPs, des EBNAs (transcrits à partir du promoteur Cp) et d'un certain nombre de protéines cellulaires comme CD21 (récepteur de l'EBV) et CD23 (marqueurs d'activation des lymphocytes B).

- **EBNA3** est constitué d'une famille de 3 gènes de haut poids moléculaire localisés en tandem sur le génome du EBV : EBNA3A (ou EBNA3), EBNA3B (ou EBNA4) et EBNA3C (ou EBNA6). Il régule négativement la trans-activation des gènes par EBNA2, EBNA3A et EBNA3C, essentiels à la transformation des cellules B *in vitro*.
- **EBNA-LP** (ou EBNA-5) code pour un ensemble de protéines extrêmement polymorphiques. Sa fonction est mal connue (Tomkinson *et al.*, 1993 ; Laux *et al.*, 1994).

➤ Les 2 gènes qui codent pour LMP :

- **LMP1** est exprimé en absence d'EBNA-2 pendant l'activation du cycle lytique des lymphocytes B.
- **LMP2** code pour une protéine de membrane contenant 12 domaines transmembranaires hydrophobes. Elle est co-localisée avec LMP-1 au niveau de la membrane plasmique des lymphocytes infectés.

➤ Les gènes qui codent les petits ARN (ARNs ou small RNA) **EBER** (EBV Encoded RNA) et **BART** (*BamHI*-A Rightward Transcripts). EBER1 et EBER2 sont les ARNs de l'EBV quantitativement les plus abondants durant la phase de latence des cellules B infectées. Ces ARNs sont codés sous forme non poly-adenylée. La majorité des EBER sont localisés dans le noyau et où ils forment un complexe avec la protéine La (antigène associé au Lupus érythémateux). La protéine La est une protéine ubiquitaire dans les cellules eucaryotes et est associé à l'extrémité 3' terminal des nouveaux ARN synthétisés (Barth *et al.*, 2007).

6-1-1- Les protéines nucléaires (la famille des EBNA) :

Dans un premier temps, l'expression des protéines EBNA est initiée à partir du promoteur Wp puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, c'est le promoteur Cp qui prend le relais. Les six protéines EBNA sont traduites à partir d'ARNm distincts issus d'un épissage différentiel d'une seule et même unité transcriptionnelle recouvrant plus de 100 kpb du génome viral. Leur transcription peut être initiée au niveau de deux promoteurs, soit le promoteur Cp, soit le promoteur Wp, de façon mutuellement exclusive. Après infection des cellules B par le virus, la transcription du génome viral est tout d'abord initiée au promoteur Wp présent dans la région de répétitions IR1. L'activité de ce promoteur Wp ne requiert pas de facteurs viraux, mais la seule présence de facteurs cellulaires. Ces premiers transcrits commencent par l'exon W0 suivi de plusieurs exons W1-W2 provenant de l'IR1 et contenant la séquence codante pour la protéine virale EBNA-LP (figure 4) (Alfieri *et al.*, 1991).

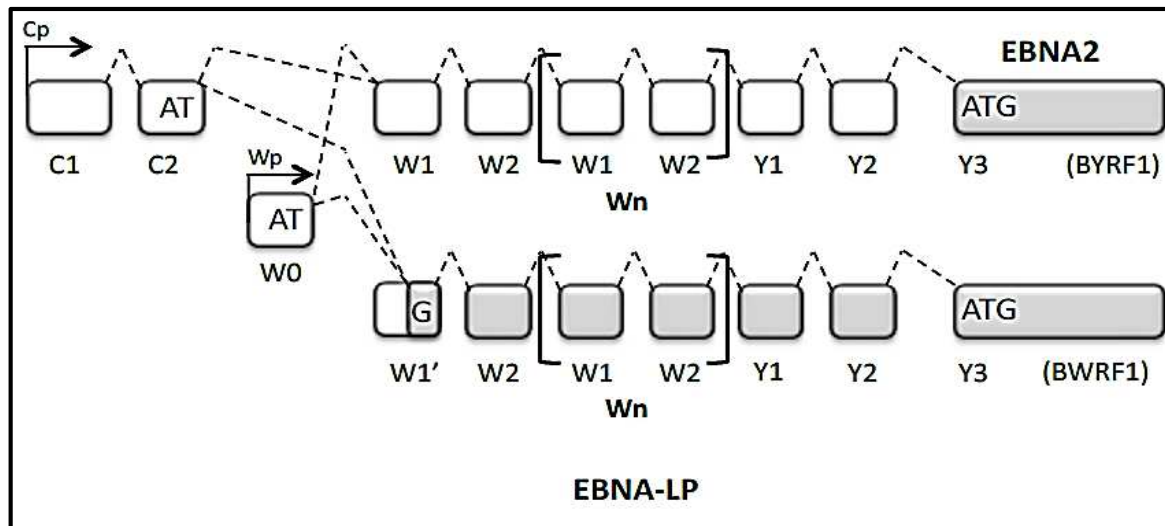


Figure 4 : Représentation schématique de l'épissage alternatif à l'exon W1/W1'.

Les épissages alternatifs WO-W1' et C2-W1' créent le codant d'initiation et de la traduction de la protéine EBNA-Lp les exons non codant sont représentés par des rectangles blancs et les régions codantes sont représentés par des rectangles blancs et les régions codantes sont représentés par des rectangles gris (d'après Roger *et al.*, 1990).

Le dernier exon W2 est épissé aux exons Y1 et Y2 et enfin à Y3 qui contient l'ORF codant pour la protéine EBNA2. Il existe par ailleurs un épissage alternatif conduisant à l'expression d'un ARNm codant ou non pour la protéine EBNA-LP. En effet, l'épissage alternatif de l'exon W0 à W1', dont le site accepteur d'épissage se situe 5 pb en aval de celui de W1, génère un codon d'initiation de la traduction pour la protéine EBNA-LP. Cet épissage alternatif conduit à un messenger bi-cistronique codant pour EBNA-LP dans sa partie 5' et pour EBNA2 dans sa partie 3'. Cependant, il semble que le produit principal de ce messenger soit la protéine EBNA-LP. L'épissage de l'exon W0 à W1 ne génère pas de codon d'initiation de la traduction pour la protéine EBNA-LP et ce messenger ne code donc que pour la protéine EBNA2. Ces protéines virales, EBNA-LP et EBNA2, sont les deux premiers antigènes viraux exprimés durant la latence (Elliott *et al.*, 2004).

Dans certains transcrits, un site donneur d'épissage situé au début de l'exon Y3 est activé et épissé à l'exon U. Cet exon U est à son tour épissé alternativement à l'un des quatre sites accepteur d'épissage qui contiennent la partie 5' de l'ORF d'EBNA-3A, -3B, -3C ou d'EBNA1.

Il est à noter que le transcrit codant pour la protéine EBNA-3B contient aussi les ORF BERF3 et BERF4 (codant pour EBNA-3C). Les ARNm codant pour les protéines EBNA-3A, -3B, -3C et EBNA1 sont beaucoup moins abondants que ceux codant pour EBNA-LP et EBNA2. Enfin, tous les antigènes nucléaires de la phase de latence d'EBV sont détectés environ 20 heures après l'infection (Tierney *et al.*, 2000).

Quelques jours après le début de l'infection, l'initiation de la transcription des EBNA passe du promoteur Wp au promoteur Cp. Ce changement de promoteur coïncide avec la méthylation progressive de l'ADN au promoteur Wp. Le promoteur Cp contient des séquences "enhancer" spécifiques d'EBNA2. Il a donc été proposé que ce soit la protéine virale EBNA2 qui, une fois exprimée à un niveau suffisant, permette ce changement de promoteur. Les transcrits initiés au promoteur Cp commencent par deux courts exons, C1 et C2, qui sont ensuite épissés alternativement à l'exon W1 ou W1' comme les transcrits initiés à Wp. Il est cependant intéressant de noter qu'il a récemment été montré que le promoteur Wp n'est jamais complètement éteint et que des transcrits provenant de ce promoteur sont toujours trouvés dans des cellules immortalisées par EBV (**Elliott et al., 2004; Hutchings et al., 2006**).

a- EBNA1 :

Les transcrits EBNA1 sont initiés à partir du promoteur Wp, au moment de la circularisation du génome viral. Puis, comme pour les autres protéines EBNA, la transcription passe sous le contrôle du promoteur Cp, une fois la transformation cellulaire établie. Dans les latences de type I et II, où la protéine EBNA1 est la seule des protéines EBNA à être produite, les promoteurs Cp et Wp sont éteints par méthylation, et le promoteur Qp prend le relais (**Schaefer et Lasanen, 2003**).

La protéine EBNA1 est retrouvée dans tous les types de latence et, de ce fait, dans toutes les pathologies associées à EBV. En effet, les propriétés biologiques de la protéine EBNA1 sont indispensables au maintien du virus dans la cellule en prolifération. Ainsi, EBNA1 se fixe sur une région de répétitions située dans l'origine de réplication plasmidique (oriP) et également sur les chromosomes de la cellule hôte lors de la mitose. Grâce à ces fixations, la protéine EBNA1 permet la réplication et le maintien du génome viral dans les cellules en prolifération. La protéine EBNA1 peut également agir en tant qu'activateur transcriptionnel, sur quelques promoteurs viraux et cellulaires (**Hebner et Lasanen, 2003**).

La localisation nucléaire ainsi que les fonctions d'EBNA1 ont été montrées comme étant régulées par des modifications post-traductionnelles. Ainsi, au niveau de la région centrale riche en glycines et arginines d'EBNA1, la méthylation sur certaines arginines semble permettre sa localisation au niveau des nucléoles, alors que la phosphorylation de sérines régule à la fois ses propriétés de trans-activateur et de maintien du génome viral (**Shire et al., 2006**). Enfin, selon la sérine ciblée au sein du signal de localisation nucléaire d'EBNA1, la phosphorylation diminue ou accroît le transport vers le noyau via un contrôle par l'importine $\alpha 5$ (**Kitamura et al., 2006**).

Quelques études montrent également l'importance de la protéine EBNA1 pour la transformation cellulaire. En effet, des souris transgéniques pour EBNA1 présentent une forte incidence de lymphomes B, et l'expression de la protéine EBNA1 dans une lignée de CNP augmente ses propriétés tumorigènes et métastatiques. De plus, indépendamment de sa fonction de maintien du génome viral, EBNA1 semble impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des cellules B infectées par EBV quel que soit le type de latence exprimée par le virus (**Kennedy et Sugden, 2003**).

b- EBNA2 et EBNA-LP :

Les protéines EBNA2 et EBNA-LP sont localisées dans le noyau et font partie des premières protéines virales exprimées dans les lymphocytes B infectés par EBV, dès l'arrivée du génome viral dans le noyau. Ces deux protéines permettent aux lymphocytes B quiescents de passer de la phase G_0 à G_1 du cycle cellulaire, notamment grâce à l'activation de la cycline D2, mais elles permettent également d'induire l'expression d'autres gènes viraux, notamment LMP1 (**Peng et Moses, 2005**). EBNA2 et EBNA-LP sont essentielles à l'immortalisation cellulaire induite par EBV. En trans-activant plusieurs promoteurs cellulaires et viraux, EBNA2 est essentielle à l'immortalisation et à la transformation, *in vitro*, des lymphocytes B. Ainsi, la protéine EBNA2 régule notamment : les gènes EBNA par l'intermédiaire du promoteur Cp, les gènes qui codent les protéines LMP1 et LMP2 ainsi que les gènes cellulaires : CD21, CD23, *c-FGR* (Gardner-Rasheed feline sarcoma viral oncogene homolog) et *c-MYC* (*v-MYC* avian myelocytomatosis viral oncogene homolog). L'activation des proto-oncogènes *c-FGR* et *c-MYC* pourrait contribuer à l'altération de la croissance et de la différenciation cellulaire. La protéine EBNA2 augmente aussi l'expression de CCR7 (récepteur de la chimiokine MIP-3 β qui permet normalement l'attraction des lymphocytes T et B) et celle des facteurs de transcription AML2 (Acute Myeloid Leukemia 2) et BATF (Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like). Ce dernier, membre de la famille AP-1/ATF (Adaptor Protein 1 / Activating Transcription Factor), régule négativement l'expression de la protéine Zta et donc inhibe l'entrée des cellules en cycle lytique. Parallèlement, l'expression de la protéine EBNA2 est associée à une diminution de l'expression de la chaîne lourde des immunoglobulines. Il faut également noter que l'activité trans-activatrice d'EBNA2 peut être fortement inhibée par des phosphorylations dépendantes du cycle cellulaire (**Yue et al., 2006**).

La protéine EBNA-LP (aussi appelée EBNA5) est majoritairement composée d'un peptide répétitif de 66 acides aminés, codé par une unité répétée de deux exons dérivés de la région IR1. L'activité co-activatrice de la protéine EBNA-LP est également régulée par sa phosphorylation, dépendante du cycle cellulaire, et par la formation de complexes protéiques et se co-localise, dans le noyau, avec les protéines pRb, p53 et p14ARF (qui inhibe la dégradation de p53) (**Young et al., 2004**).

Alors que la transfection de p14ARF induit l'arrêt de la croissance et la mort cellulaire, la présence d'EBNA-LP réduit considérablement cet effet. Ainsi, il a été suggéré que la protéine EBNA-LP pourrait bloquer l'action de p14ARF et donc diminuer le niveau de la protéine p53, dont l'expression est élevée au début de l'infection par l'EBV (Ling *et al.* 2005).

c- Les EBNA3 :

Les protéines EBNA3 (EBNA3A, 3B et 3C) sont localisées dans le noyau, associées à la matrice nucléaire et au nucléoplasme. Elles régulent l'expression de gènes cellulaires et se fixent à certaines protéines cellulaires comme RBP-J κ . Cette interaction module la trans-activation EBNA2-dépendante des promoteurs cellulaires et viraux. Ainsi, EBNA3C induit l'expression de la protéine virale LMP1, de CD21, et permet de réprimer le promoteur Cp. Les effets répresseur d'EBNA3A et 3C sont notamment dus à leur fixation à RBP-J κ qui interfère avec celle d'EBNA2. EBNA3C a un effet plus direct sur le cycle cellulaire puisqu'elle supprime l'arrêt en G₂/M, normalement observé après l'action d'agents génotoxiques et pourrait ainsi contribuer à l'accumulation de dommages sur l'ADN. Contrairement aux protéines EBNA3A et EBNA3C, la protéine EBNA3B ne semble pas essentielle à la transformation des lymphocytes B *in vitro* (Wade et Allday, 2000).

6-1-2- La famille des LMPs (Les protéines membranaires) :

Les transcrits codant pour les protéines membranaires du virus d'Epstein-Barr sont initiés à partir de deux promoteurs spécifiques activés par la protéine nucléaire EBNA2. Le promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2Bp ainsi que le promoteur LMP2Ap se situent au niveau des TR du génome d'EBV

Le transcrit codant la protéine LMP1 est formé de trois exons et est synthétisé vers la gauche, contrairement à tous les autres transcrits exprimés durant la phase de latence. Ce transcrit est initié à partir du promoteur bidirectionnel LMP1/LMP2Bp. Les transcrits codant pour les protéines LMP2A et LMP2B, encore appelées TP1 et TP2, sont formés de multiples exons situés de part et d'autre des TR. Ainsi leur synthèse ne peut être initiée qu'après la circularisation du génome. Le transcrit codant pour LMP2B est initié à partir du promoteur bidirectionnel permettant aussi de transcrire l'ARNm codant pour LMP1 alors que le transcrit codant pour LMP2A est initié par le promoteur LMP2Ap (Young *et al.*, 2004).

a- LMP1 :

Le transcrite correspondant à la protéine LMP1 est le plus abondant du cycle de latence (50 à 60 copies par cellule dans la latence de type III) et est synthétisé vers la gauche, contrairement à tous les autres transcrits exprimés durant la latence. LMP1 est une protéine de membrane ayant une demi-vie courte (environ 3h). Elle est fortement associée au cytosquelette et forme constitutivement des agrégats dans la membrane plasmique, même en l'absence de facteurs de croissance exogènes ou d'autres protéines virales. Elle comprend 3 domaines : un domaine N-terminal cytoplasmique de 24 acides aminés, un domaine transmembranaire de 162 acides aminés composé de 6 hélices α et un domaine C terminal cytoplasmique de 200 acides aminés. Les domaines N-terminal et transmembranaire sont responsables de l'ancrage de LMP1 à la membrane et de son agrégation constitutive. Le domaine C terminal cytoplasmique est, quant à lui, impliqué dans l'activation des voies de signalisation cellulaire induites par LMP1. LMP1 est considéré comme l'oncogène majeur d'EBV. Grâce à sa signalisation, LMP1 présente des propriétés immortalisantes et transformantes, et est responsable de nombreux changements phénotypiques dans les cellules infectées par l'EBV (Young *et al.*, 2004).

La région de LMP1 responsable de l'induction des voies de signalisation cellulaire est incluse dans la partie C terminal cytoplasmique de la protéine. Cette région se subdivise en 2 domaines importants dits C Terminal Activating Region (CTAR)-1 et CTAR-2 qui incluent eux-mêmes les sites dits Transforming Effector Sites (TES)-1 et TES2, dont les rôles dans la signalisation et la transformation se recouvrent en grande partie. Ces 2 domaines sont responsables de l'activation des voies p38 et JNK/AP1 et de l'activité NF- κ B induite par LMP1. Les médiateurs proximaux de ces voies identifiés à ce jour et interagissant directement avec LMP1 ont également été caractérisés au préalable par leur interaction avec les membres de la famille des récepteurs au TNF α (TNF-R). Il s'agit des protéines TRAF (TNFR Associated Factors, interagissant avec TES1) et TRADD (TNF-R Associated Death Domain, interagissant avec TES2) (Merchant et Swart, 2001).

b- Les LMP2 :

Les ARNm de LMP2A et LMP2B sont transcrits à partir du même gène mais de promoteurs différents. Le promoteur de LMP2B est en fait pLMP1 puisque ce promoteur est bidirectionnel. Ainsi, la protéine LMP2B est une version tronquée de LMP2A à laquelle il manque tout le domaine amino-terminal cytosolique. LMP2A joue un rôle important dans le maintien à l'état latent du virus *in vivo*. En effet, LMP2A possède des motifs ITAM (Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motifs) qui permettent de lier et de séquestrer les tyrosine kinases Lyn et Syk nécessaires à la signalisation du récepteur des lymphocytes B (BCR) (Merchant et Swart, 2001).

La protéine LMP2A recrute également les ligases (E3) qui vont ubiquitinyler les protéines Lyn et Syk et donc activer leur dégradation par le protéasome. En bloquant la voie de signalisation du BCR, la protéine LMP2A inhibe le passage de la latence au cycle lytique, normalement induit par la signalisation du BCR. Cependant, LMP2A stimule à un certain degré les tyrosines kinases et fournit des signaux de survie mimant l'activation du BCR, empêchant ainsi les lymphocytes B de suivre leur développement normal dans les centres germinatifs. Les transcrits de LMP2A ou LMP2B sont fréquemment détectés dans les lymphomes de Hodgkin, le carcinome du naso-pharynx et dans le Lymphome de Burkitt suggérant que LMP2A est un facteur clé dans la capacité d'EBV à contribuer aux cancers humains. LMP2A est en effet capable de participer à la transformation des cellules épithéliales notamment grâce à l'activation des voies de signalisation cellulaire PI3K-Akt et β -caténine, mais également à leur pouvoir métastatique (**Pang et al., 2009**).

6-1-3-Les ARN viraux non codants :

a- EBER 1 et EBER 2 :

Les EBER-1 et -2 sont deux petits ARN de respectivement 167 et 172 nucléotides, non poly-adenylés et non codants. Ces deux ARN sont synthétisés par l'ARN polymérase III au niveau de la région BamHI-C du génome viral en amont de l'oriP. Ils représentent, avec environ 107 copies par cellule, les transcrits viraux les plus abondants dans des cellules infectées par EBV. Il a récemment été montré que la protéine virale EBNA1 est capable d'augmenter la transcription des ARN EBER en induisant l'expression des facteurs de transcription associés à leur l'expression. Des expériences d'hybridation *in situ* ont montré que les ARN EBER sont localisés dans le noyau des cellules infectées par EBV (**Owen et al., 2010**).

Ces EBER en interagissant avec plusieurs protéines cellulaires, dont la protéine PKR, la protéine ribosomale L22, l'antigène La, forment des complexes ribonucléiques très stables. Il a été montré que les EBER confèrent une résistance à l'apoptose induite par l'interféron α (IFN- α) en interagissant avec la PKR et en inhibant sa phosphorylation. De plus, les EBER induisent l'expression de plusieurs cytokines cellulaires dont l'interleukine 10 (IL-10) dans les cellules B, l'IL-9 dans les cellules T et l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) dans les cellules épithéliales, chacune fonctionnant comme un facteur de croissance autocrine. Cependant, les mécanismes par lesquels les EBER induisent ces cytokines restent encore à être élucidés (**Yang et al., 2004; Nanbo et al., 2005**).

Il a été démontré qu'une délétion de la région exprimant les EBER du génome viral ne perturbe ni l'immortalisation des cellules B *in vitro* par EBV, ni la réplication virale.

Cependant, la réintroduction des EBER dans des lignées de lymphome de Burkitt EBV négative restaure leurs capacités à pousser sous agar mou, à induire des tumeurs dans des souris, à résister à l'induction de l'apoptose et à sur-exprimer l'onco-protéine BCL2. Toutes ces études suggèrent que les ARN EBER bien que non essentiels pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro* par EBV, pourraient avoir une contribution importante dans les pathologies associées à EBV *in vivo* (Nanbo *et al.*, 2005).

b- Les ARN BART et les micros ARN viraux :

Les ARN BART (Rightward Transcripts of the *BamH1* A region) ont été identifiés pour la première fois dans des tissus de carcinome du naso-pharynx et sont retrouvés dans toutes les latences virales d'EBV. Un virus possédant un génome dépourvu de la région BART ne voit pas sa capacité à immortaliser des lymphocytes B *in vitro* altérée indiquant que les ARN BART ne sont pas essentiels. Les transcrits provenant de cette région BART sont différentiellement épissés et plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) ont pu être identifiés incluant BARF0, RK-BARF0, A73 et RPMS (Smith *et al.*, 2000), mais la question de la production de protéines à partir de ces différentes ORF *in vivo* est très controversée. Cependant, des études réalisées *in vitro* suggèrent différents rôles pour ces protéines. Il a notamment été montré que la protéine RPMS1 serait impliquée dans la régulation négative de la voie Notch et EBNA2 (Van-Beek *et al.*, 2003).

Cette région BART du génome viral est aussi le lieu d'expression de la grande partie des micros ARN retrouvés chez EBV. Les microARN (miARN) sont des petits ARN non codants d'environ 21-24 nucléotides de longueur qui jouent un rôle dans l'inhibition post-transcriptionnelle d'ARNm cibles (Bartel *et al.*, 2004). Le virus d'Epstein-Barr a été le premier virus humain pour lequel des miARN ont été identifiés (Pfeffer *et al.*, 2004).

Les miARN d'EBV sont localisés dans deux clusters différents sur le génome d'EBV, un au niveau de la région BART et un au niveau du gène BHRF1 (codant pour une protéine homologue de BCL2). Les miARN de la région BART sont produits à partir des introns des transcrits BART, excepté le miARN-BART2 qui est transcrit à partir du brin antisens de la région 3'UTR du gène BALF5 (codant pour l'ADN polymérase virale). Ces deux clusters de microARN sont différemment exprimés en fonction de la latence virale. En effet, les miARN-BART sont fortement exprimés dans les cellules en latence II (par exemple dans des cellules provenant de cancer du naso-pharynx), alors qu'ils sont à peine détectables dans les LCL (latence III) et la plupart des BL (latence I). À l'inverse, les miARN BHRF1 sont associés à la latence III et à l'utilisation du promoteur Cp/Wp. Ceci suggère que les miARN BHRF1 sont issus d'un intron provenant du large transcrit codant les EBNA (Pfeffer *et al.*, 2004 ; Cai *et al.*, 2006; Cullen, 2006).

Le rôle exact de tous les miARN d'EBV reste à élucider, même si certaines études montrent que certains de ces miARN auraient un rôle régulateur de l'immortalisation par EBV. Il a notamment été montré que le cluster de miARN BHRF1 contribue à la transformation de cellules B par EBV *in vitro*. En effet, l'utilisation d'un virus mutant dépourvu de ce cluster de miARN montre une capacité de transformation réduite par rapport à un virus sauvage. Ces miARN BHRF1 permettent d'inhiber l'apoptose et de favoriser la progression du cycle cellulaire dans les phases précoces de l'infection par EBV. Il a de plus été montré que le microARN-BART2 réprime l'expression de l'ADN polymérase virale BALF5 en entraînant la dégradation de l'ARN messager codant pour BALF5 et que le microARN-BART5 réprime l'expression de la protéine PUMA (protéine pro-apoptotique). Enfin, certains miARN BART permettent de réguler négativement l'expression de la protéine de latence LMP1, protéine essentielle à l'immortalisation mais pouvant devenir toxique pour les cellules si elle est surexprimée (Lo et al., 2007; Seto et al., 2010 ; Feederle et al., 2011).

7- Biologie de l'infection par l'EBV :

La transmission de l'EBV à un hôte naïf s'effectue normalement via la salive provenant d'un individu positif. Selon le modèle représenté dans la **figure 5**, il y aurait premièrement un événement lytique avec production de virus au niveau de l'épithélium mucosal du naso-pharynx. Vu le contact étroit avec la couche sous-épithéliale riche en lymphocytes, l'EBV peut alors atteindre sa principale cible, le lymphocyte B mature (Hutt-Fletcher, 2007).

Selon certains auteurs celui-ci serait capable, exceptionnellement, de soutenir l'infection lytique. L'entrée du virus dans les lymphocytes B est médiée par l'interaction de la glycoprotéine majeure du virus, la gp350, avec le récepteur CD21 présent à la surface de la cellule cible. D'autres molécules de surface agissent comme co-récepteurs pour l'infection des lymphocytes B, notamment le CMH II qui lie la glycoprotéine virale, la gp42. Ainsi, les interactions entre ligand et récepteur mises en œuvre, assurent l'entrée du virus dans la cellule B naïve par internalisation dans des vésicules cytoplasmiques (Callan, 2004).

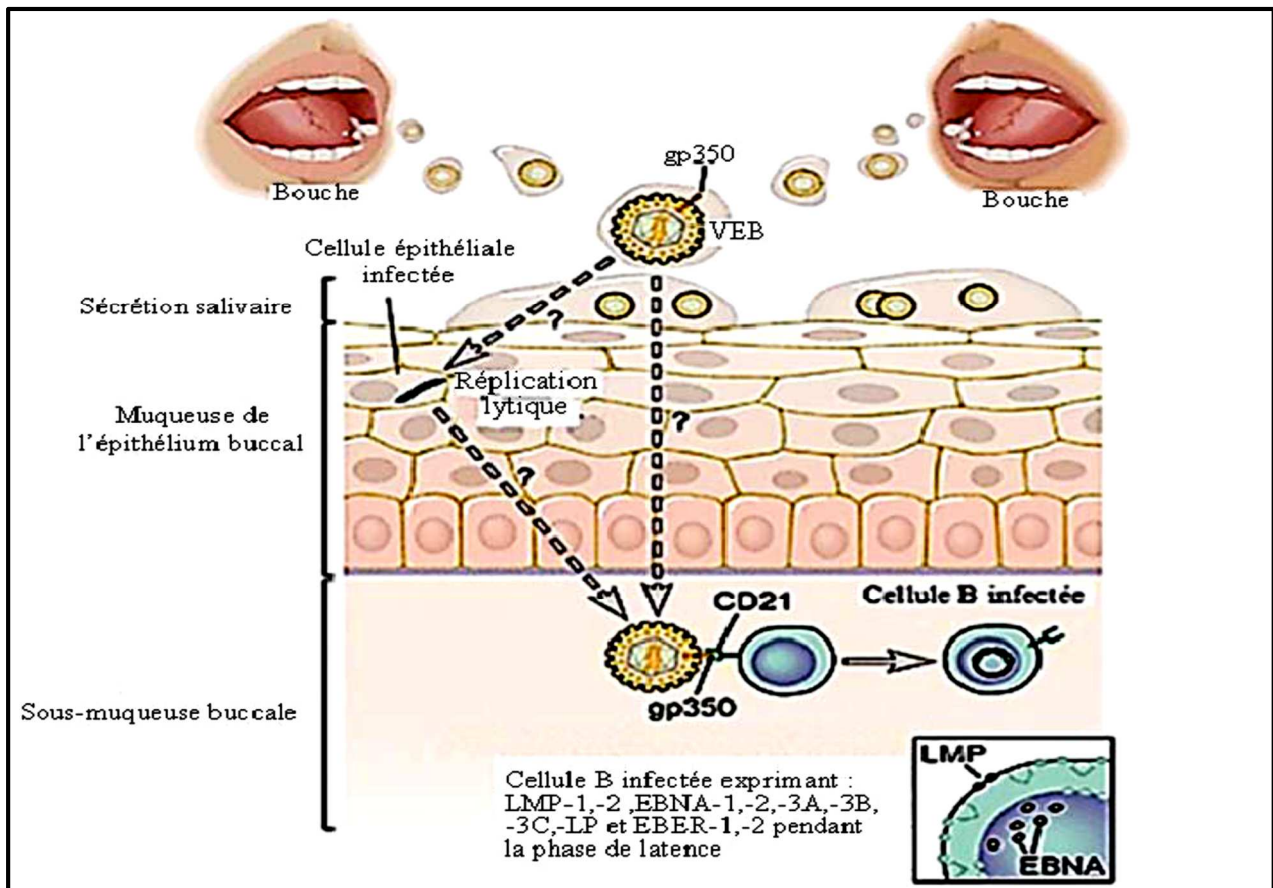


Figure 5 : Représentation schématique des étapes précoces de l'infection par l'EBV.

Après un contact étroit, les particules virales présentes dans la salive des individus infectés pénètrent dans la muqueuse épithéliale où il peut y avoir une répllication lytique. La proximité au tissu lymphoïde sous-jacent, riche en lymphocytes B, permet l'infection de ces derniers via l'interaction entre le CD21 exprimé à la surface de la cellule B et la glycoprotéine virale, la gp350. Suite à l'infection des lymphocytes B, et dépendamment des circonstances relatives à l'hôte, l'EBV peut adopter un état de latence voulant l'expression d'un ou de plusieurs gènes viraux. Le programme de latence III est caractérisé par l'expression de tout le répertoire des gènes viraux. LMP, protéine membranaire latente; EBNA, antigène nucléaire du virus Epstein-Barr (d'après Kutok et Wang, 2006).

Bien que l'infection lytique dans la cellule B soit possible, cette dernière est plus apte à restreindre l'expression des gènes viraux à un programme de latence. Pour ce faire, le génome linéaire se circularise au niveau des TR donnant ainsi naissance à la forme épisomale du génome viral caractérisant l'établissement de la latence et constituant un pré-requis pour l'initiation de l'expression des gènes de latence. Quatre programmes de latence sont décrits selon les profils de gènes exprimés (Hardie, 2010) (tableau I).

Tableau I : Programmes de latence de l'EBV et les patrons d'expression les caractérisant (d'après Hardie, 2010).

Programme de latence	Gènes exprimés
Latence 0	EBERs
Latence I	EBNA1, EBERs
Latence II	EBNA1, LMP-1 et 2, EBERs
Latence III	EBNA1, 2 et 3, LMP-1 et 2, EBERs

À noter que seul le programme de latence III permet l'expression de tous les gènes de latence encodés par l'EBV, notamment les gènes spécifiques aux six antigènes nucléaires EBNA, aux trois protéines membranaires et des deux EBERs. Les protéines de latence interagissent d'une part entre elles et d'autre part avec les facteurs de transcription cellulaire pour garantir l'activation et la prolifération des cellules B infectées. Par ailleurs, ces dernières s'engagent, dans les centres germinaux, dans une dynamique d'expansion clonale, de différenciation et de survie en absence de toute stimulation par les lymphocytes T ou par les signaux de survie. Ceci aboutit à la différenciation des cellules B infectées en cellules mémoires, principal réservoir du virus. Selon ce modèle, l'EBV en état de latence 0 assurerait ainsi sa persistance dans l'organisme pendant toute la durée de vie de l'individu sans avoir à exprimer aucun gène latent (à l'exception des EBERs). Lors de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes, on assiste à la réactivation du virus qui se traduit par une initiation de la phase lytique du cycle viral aboutissant à la production de nouveaux virions. La dite phase implique l'expression séquentielle d'approximativement 80 gènes lytiques codant respectivement pour :

- (i) des protéines pré-précoces IE (Immediately Early), agissant comme trans-activateurs de l'expression des gènes précoces,
- (ii) des protéines précoces EA (Early Antigen) incluant les principaux acteurs du complexe de la réplication de l'ADN viral,
- (iii) des protéines lytiques tardives qui ne sont autres que les protéines structurales du virion et qui témoignent d'une infection répliquative productive. L'ADN linéaire viral est par la suite clivé au niveau des TRs, encapsidé et le virus enveloppé est libéré suite à la mort des cellules B (Hardie, 2010).

8- Cycle viral :

8-1- Les voies de contamination :

La transmission de l'EBV se fait essentiellement par contact direct avec la salive. Ce mode de transmission peut expliquer le caractère ubiquitaire et précoce de l'infection par l'EBV : 100 % des enfants sont infectés avant l'âge de deux ans en Afrique intertropicale alors que dans les pays développés, l'infection peut survenir dans l'adolescence ou encore à l'âge adulte. Des contaminations par transfusion sanguine, voies sexuelles ou lors de transplantations d'organes ont été rapportées. La présence de l'EBV dans le lait maternel a également été constatée. Après contact entre individus infectés, le virus pénètre dans la cavité buccale (Young *et al.*, 2004).

8-2- Entrée du virus dans ses cellules cibles :

Le virus d'Epstein-Barr est associé à un grand nombre de pathologies telles que le Lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, le carcinome du naso-pharynx ainsi que des lymphomes T/NK. EBV est donc capable d'infecter différents types cellulaires : lymphocytes B, cellules épithéliales, cellules T/NK. L'infection commence par l'entrée d'un virus enveloppé dans une cellule ce qui implique au moins deux phénomènes différents : la fixation du virus à sa cellule cible et la pénétration à travers la membrane cellulaire. Cette pénétration implique la fusion de l'enveloppe du virion avec la membrane de la cellule cible et peut se produire à la surface cellulaire ou après endocytose. L'entrée du virus d'Epstein-Barr dans les lymphocytes B et les cellules épithéliales est la mieux décrite et diffère à la fois en terme de protéines (virales et cellulaires) impliquées et de voies de signalisation mises en jeu (Molesworth *et al.*, 2000 ; Hutt-Fletcher, 2007).

8-2-1- Entrée du Virus dans les Lymphocytes B :

L'infection commence par la fixation du virus à la cellule B. Pour cela l'EBV utilise le récepteur cellulaire CD21, récepteur appartenant à la famille des immunoglobulines et fixant le fragment C3d du complément. L'EBV se lie au récepteur CD21 via sa glycoprotéine d'enveloppe gp350/220 permettant ainsi la fixation de la particule virale sur la cellule. La gp350/220 est une protéine virale très abondante et fortement glycosylée. Sa double nomenclature est due au fait que cette protéine possède deux formes issues d'ARNm différemment épissés, une de 350 kDa et une de 220 kDa. Cette fixation d'EBV à la surface des cellules B par l'intermédiaire du récepteur CD21 stimule l'endocytose du virus. Ce phénomène est nécessaire à l'entrée du virus dans les lymphocytes B. En effet, le traitement de cellules B avec le chlorpromazine, un inhibiteur de l'endocytose, inhibe l'entrée du virus dans la cellule (Molesworth *et al.*, 2000).

La fusion de l'enveloppe du virus avec la cellule B nécessite au moins trois glycoprotéines virales formant un tri-complexe non-covalent : la gp85, la gp25 et la gp42. Un virus recombinant n'exprimant plus la protéine gp85 est encore capable de se fixer sur les lymphocytes B, mais ne peut plus les infecter. La protéine gp42 se lie aux molécules du CMH II déclenchant alors le mécanisme de fusion. La protéine gp42 est donc indispensable à la fusion du virus avec la membrane cellulaire du lymphocyte B (Oda et al., 2000).

Le modèle d'entrée du virus dans une cellule B est donc le suivant : la fixation de la particule virale via l'interaction gp350/CD21 stimule l'endocytose du virus, puis, la glycoprotéine gp42 du tri-complexe gp85-gp25-gp42 interagit avec le CMH classe II et cet événement active le mécanisme de fusion (Molesworth et al., 2000; Oda et al., 2000 ; Hutt-Fletcher, 2007).

8-2-2- Entrée du Virus dans les cellules épithéliales :

Outre les pathologies malignes lymphoïdes, l'EBV est associé à des cancers épithéliaux, comme le carcinome du rhinopharynx (CRP) ou le carcinome gastrique, suggérant son tropisme pour ce type cellulaire.

In vivo, l'EBV infecte les cellules épithéliales de l'oropharynx et/ou des amygdales. Néanmoins, le fait que leur infection ait lieu précédemment ou subséquent à celle des lymphocytes B est une question encore débattue dans la littérature. En revanche, lorsque l'infection a lieu, l'EBV y effectue un cycle réplicatif qui induit la destruction de ces cellules. L'infection de ce type cellulaire est moins bien comprise que celle des lymphocytes B car, contrairement aux lymphocytes B, les cellules épithéliales n'expriment pas le récepteur CD21. Cependant, différentes équipes ont réussi à infecter efficacement des cellules épithéliales en les co-cultivant avec des LCLs suggérant que des contacts directs entre ces deux types cellulaires pourraient permettre l'entrée du virus dans des cellules malgré l'absence du CD21. Trois voies d'entrée du virus ont été décrites (Pegtel et al., 2004 ; Hadinoto et al., 2009).

Une étude *in vitro* a montré que des immunoglobulines A (IgA) dirigées contre la gp350/220 de l'EBV favorisent l'infection des cellules épithéliales par un mécanisme d'endocytose du complexe IgA-EBV. En absence du CD21, l'EBV peut s'attacher aux cellules épithéliales grâce à ses protéines gH et gL et aux intégrines présentes à la surface des cellules. Les virions produits par des LCLs possèdent peu de gp42 à leur surface, augmentant leur tropisme pour les cellules épithéliales. A l'inverse, les virions produits par les cellules épithéliales possèdent un plus grand nombre de gp42 qui interagiront avec le CMH de classe II des lymphocytes B (figure 6) (Chesnokova et al., 2009).

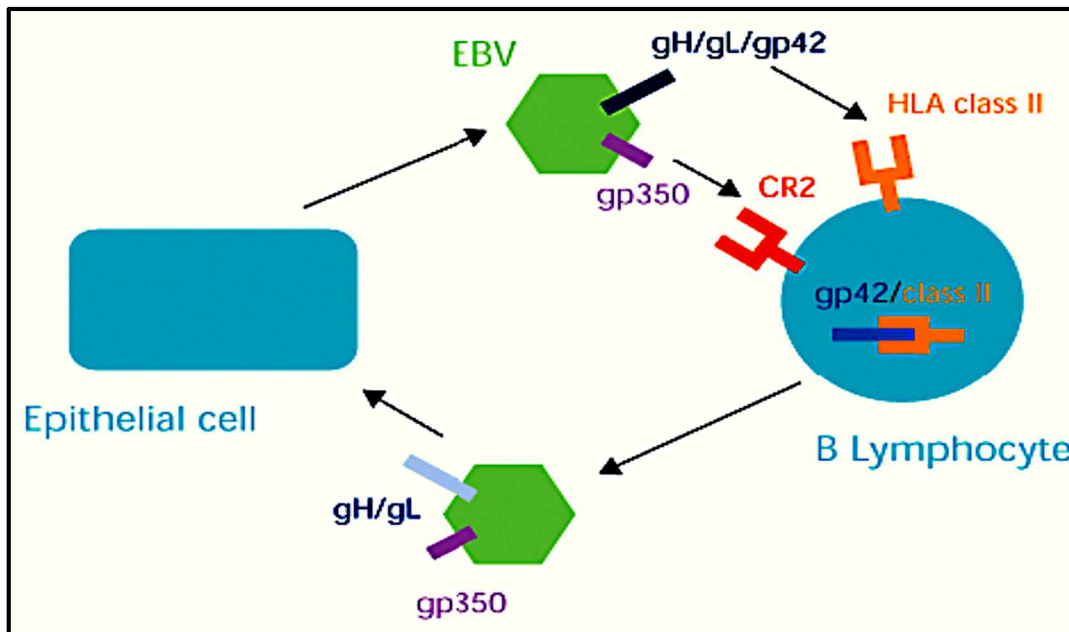


Figure 6 : Modèle de l'infection des lymphocytes B et des cellules épithéliales par l'EBV (d'après Farrell, 2000).

L'EBV infecte les lymphocytes B par interaction entre la gp350 et le CD21 (CR2) puis entre le complexe gH/gL/gp42 et le CMH de classe II. Les virions produits par la LCL sont dépourvus de la gp42 qui est séquestrée par le CMH II et peuvent infecter les cellules épithéliales grâce à l'interaction du complexe gH/gL et de son récepteur. Les virions produits par la réplication virale dans les cellules épithéliales expriment de hauts niveaux de gp42 et peuvent donc infecter d'autres lymphocytes B (Farrell, 2000).

Enfin, plus récemment, il a été décrit un processus par lequel l'EBV utilise les lymphocytes B comme transporteur pour ensuite infecter les cellules épithéliales. Ce processus se déroule en 3 étapes :

- (i) Fixation de virions de l'EBV à la surface des lymphocytes B grâce à l'interaction gp350/CD21,
- (ii) Formation d'une synapse intercellulaire entre lymphocytes B et cellules épithéliales,
- (iii) Fusion et absorption du virus par les cellules épithéliales. Ce mécanisme d'infection se déroule au niveau des surfaces baso-latérales des cellules épithéliales et nécessite CD11b à la surface des lymphocytes B et CD44v3 (CD44 variant 3) ainsi que LEEP-CAM (Lymphocyte-Endothelial-Epithelial Cell Adhesion Molecule) à la surface baso-latérale des cellules épithéliales (Shannon-Lowe et al., 2006).

8-3- Établissement d'une infection latente :

Les lymphocytes B sont les cellules clefs pour l'établissement de la latence virale. En effet, les patients présentant une hypo-gamma-globulinémie liée à l'X et qui manquent de lymphocytes B ne présentent pas d'infection EBV persistante (**Faulkner et al., 1999**). Suite à l'infection par EBV, *Thorley-Lawson* et *Gross* décrivent une activation et une prolifération des lymphocytes B naïfs infectés similaire à celle obtenue avec une stimulation antigénique.

C'est en fait l'expression des protéines virales de latence III (dit également "programme de croissance") qui permet ce phénomène mimant ainsi une stimulation naturelle. La cellule ainsi stimulée migre ensuite vers le ganglion lymphatique où le programme d'expression virale change. Seules 3 protéines virales EBNA1, LMP1 et LMP2 sont exprimées. EBNA1 permet le maintien du génome viral sous forme d'épisome et sa réplication par l'ADN polymérase cellulaire. Le génome viral est ainsi également réparti entre les cellules filles lorsqu'une cellule infectée par EBV se divise. LMP2 pousse la cellule à former un centre germinale. LMP1, en mimant le signal émis par le CD40, et LMP2, en mimant celui du BCR, vont permettre la mutation des gènes des immunoglobulines ainsi que le switch isotypique. LMP1 réprime *in vitro* l'expression du facteur de transcription régulateur du centre germinale : bcl-6, favorisant ainsi la transformation en cellule B mémoire et le départ de ces cellules du centre germinale. Des observations récentes laissent cependant penser que ce rôle de LMP1 pourrait être différent *in vivo*. Une seconde hypothèse est fondée sur l'infection préférentielle des lymphocytes B mémoire et non naïfs (**Thorley-Lawson et Gross, 2004 ; Roughan et al., 2010**).

Ces cellules subiraient une expansion clonale dirigée par le programme de croissance viral. Cette hypothèse a été émise pour expliquer l'absence de marqueurs phénotypiques du centre germinale sur les cellules infectées par EBV identifiées par microdissection et présentes dans les centres germinatifs des amygdales. Cependant, une étude récente montre que le programme de latence II (dit "de défaut") est compatible avec le maintien de la fonctionnalité du centre germinale et offre ainsi un argument de poids pour penser que le centre germinale est un nœud crucial pour le développement de pathologies lymphoïdes associées à EBV comme les lymphomes de Hodgkin et de Burkitt (**figure 7**) (**Roughan et Thorley-Lawson, 2009 ; Rowe et al., 2009**).

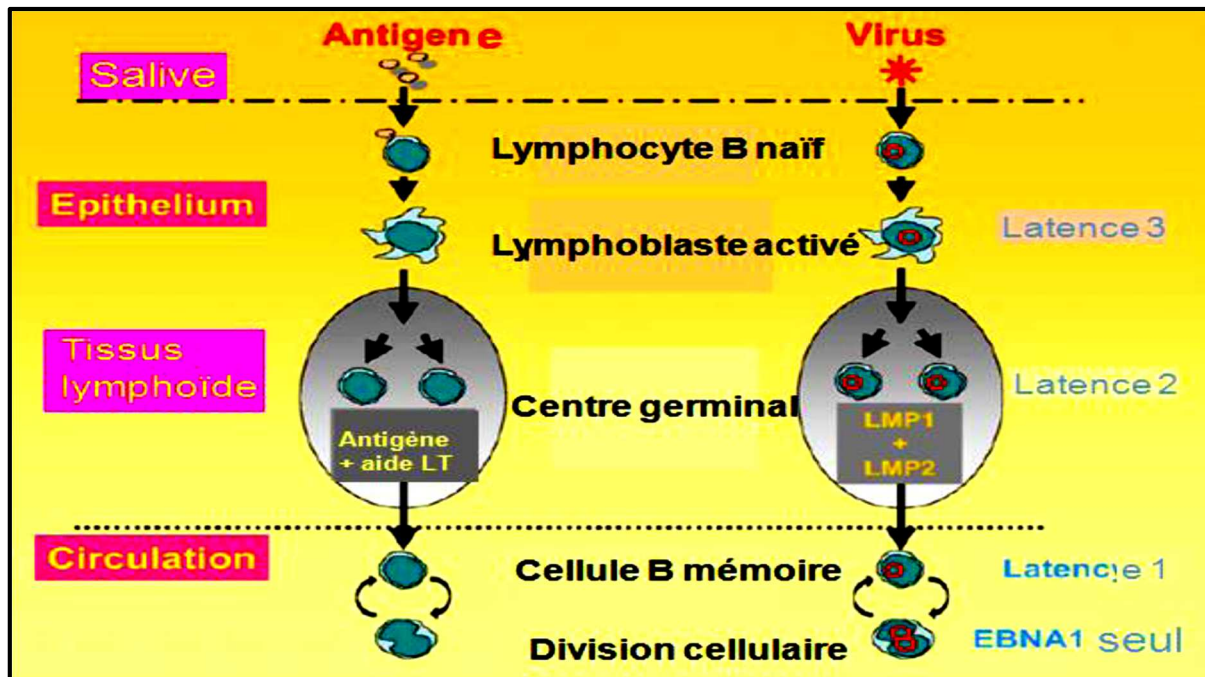


Figure 7 : Schématisation de la façon dont EBV utilise la biologie des cellules B afin d'établir et de maintenir son infection dans le compartiment mémoire (d'après Thorley-Lawson et Gross, 2004).

8-4- Persistance virale :

Une fois en périphérie, les cellules B mémoire infectées par du virus latent vont arrêter toute production de protéines virales. C'est la latence de type I ou 0. Immédiatement après l'infection aiguë, la proportion de cellules de ce type dans le sang peut atteindre 50 % des cellules B mémoires d'un individu. Mais ce nombre diminue rapidement et un an après l'épisode infectieux aigu, on retrouve 1 cellule infectée par EBV sur 10⁵ à 10⁶ lymphocytes B mémoires. Il semble alors que ce nombre se stabilise reflétant certainement l'équilibre entre les lymphocytes B mémoires qui se divisent, les nouveaux lymphocytes B mémoires infectés et ceux qui vont être détruits par la reprise de la multiplication virale. La division cellulaire est vraisemblablement le fait de l'homéostasie cellulaire car aucune protéine produite par le virus ne permet de provoquer cette division. En revanche, lorsque la cellule mémoire se divise, la protéine virale EBNA1 est produite permettant une multiplication du génome viral et sa division entre les cellules filles. EBNA1 est très peu immunogène et ne déclenche donc pas de réaction contre ces cellules mémoires en division. La capacité de la région répétée glycine-alanine d'EBNA1 d'inhiber la dégradation par le protéasome et la présentation des peptides d'EBNA1 par les molécules du CMH contribue également certainement à cet échappement au système immunitaire. Le virus persiste dans le compartiment B mémoire à l'abri du système immunitaire (Hochberg *et al.*, 2004).

8-5- Réplication virale :

Afin de pouvoir infecter de nouveaux hôtes et également renforcer le pool de cellules B mémoires porteuses du virus, EBV doit pouvoir aboutir à une excrétion de particules virales infectieuses. Les signaux naturellement à l'origine de la différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes sécréteurs vont également permettre au virus de se réactiver. La capacité des cellules B mémoires infectées à se transformer en plasmocytes où le virus se réplique est confirmée.

La connaissance du cycle lytique est limitée car il n'existe pas de système de culture permettant l'étude de ce cycle complet. De plus, le cycle lytique aboutit la plupart du temps à la mort de la cellule hôte (du moins lymphoïde). Les données actuellement disponibles viennent de lignées cellulaires porteuses de formes latentes d'EBV et dans lesquelles la multiplication virale est induite par un phénomène extérieur (agent chimique, liaison avec des immunoglobulines...). Lors de son cycle réplcatif, le virus, dont le génome est alors linéaire et extra-chromosomique, utilise la machinerie enzymatique virale et celle de la cellule infectée pour exprimer les protéines du cycle lytique, se répliquer et produire de nouveaux virions. L'expression des gènes du cycle lytique se fait de manière séquentielle. Les produits des gènes très précoces activent l'expression des gènes précoces, qui induisent la réplcation du génome viral nécessaire à la transcription des gènes tardifs. Les produits de ces gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses (figure 8) (Al Tabaa et al., 2009).

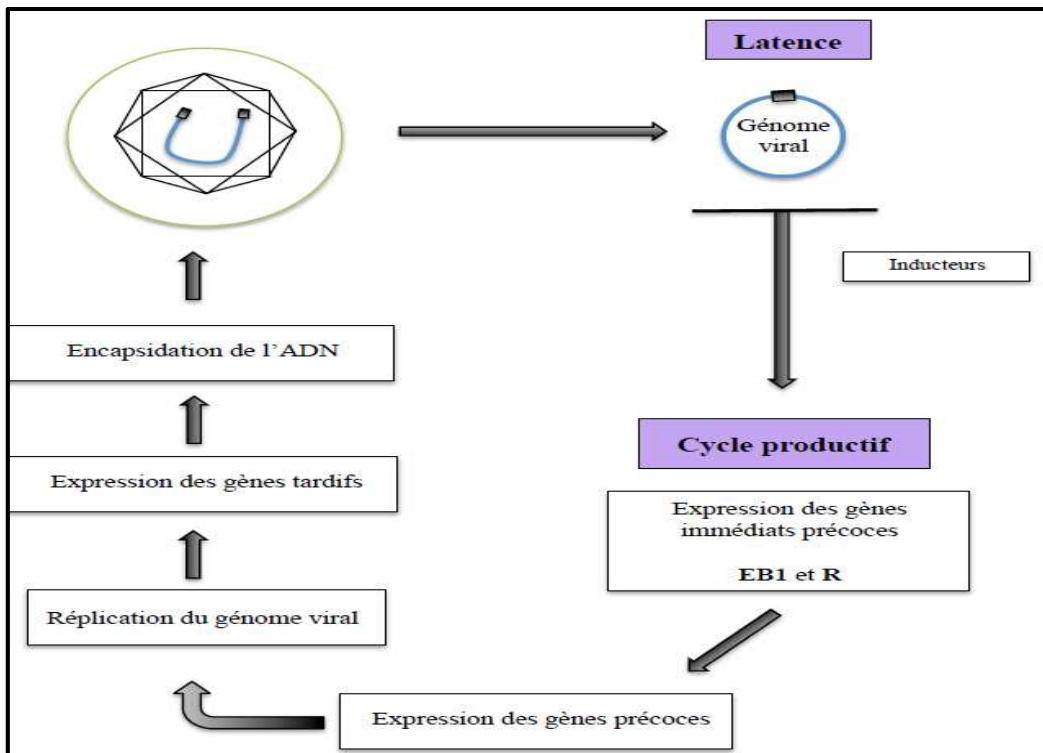


Figure 8 : Cycle virale productif de l'EBV dans les cellules *in vitro* (d'après Manet et al., 2003).

8-5-1- Les gènes immédiats précoces :

Le cycle productif d'EBV débute par l'expression de gènes dits « immédiats précoces », les gènes BZLF1 et BRLF1 codant respectivement pour les facteurs de transcription EB1 (encore appelé Zebra ou Zta) et R (encore appelé Rta)

EB1 est la première protéine virale à être exprimée. Elle détermine l'entrée du virus dans la phase productive en coopération avec la protéine R. EB1 est un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines « b-zip » (pour « basic leucine zipper ») qui se fixe sous forme d'hétérodimère à l'ADN. Il a notamment été montré que la seule expression de la protéine EB1 dans des cellules infectées par EBV est nécessaire et suffisante à l'induction du cycle productif (**Manet et al., 2003**).

La phase de latence fait suite à l'infection, de cette phase de latence il peut y avoir l'activation du cycle virale productif. *In vitro* cette activation peut être induite par des inducteurs chimiques ou biologiques. Le cycle productif est caractérisé par l'expression séquentielle des gènes viraux : les protéines immédiates précoces permettent l'expression des gènes précoces, les produits de ces gènes précoces sont impliqués dans la réplication du génome viral, réplication qui précède l'activation des gènes tardifs codant pour des protéines de structure de particule virale.

Ce facteur de transcription viral joue un rôle dans l'activation du cycle productif en activant son propre promoteur, le promoteur du gène BRLF1 et ceux des gènes précoces. De plus, il a été montré qu'EB1 est capable d'inhiber les promoteurs Cp, Wp et LMP1/LMP2Bp, promoteurs utilisés en latence (**Sinclair et al., 1991**).

La protéine R codée par le gène BRLF1 est un facteur de transcription qui agit sous forme de dimère en se fixant à l'ADN au niveau de nombreux promoteurs de gènes précoces. R et EB1 agissent au niveau de certains promoteurs précoces de manière synergique. Enfin, il a été rapporté que la protéine R seule est capable d'activer le cycle lytique dans des cellules épithéliales et dans certaines cellules B mais de manière moins efficace que la protéine EB1 (**Zalani et al., 1996 ; Westphal et al., 1999**).

8-5-2- Les gènes précoces :

Les gènes précoces sont définis comme les gènes viraux exprimés après réactivation mais avant la réplication du génome viral. Le génome viral est répliqué probablement suivant le mécanisme du cercle roulant via deux origines de réplication ori-Lyt. La réplication de ce génome met en jeu un complexe de réplication d'origine virale composé d'une ADN polymérase (BALF5) et de son facteur de processivité (BMRF1), d'une hélicase (BBLF4), d'une protéine de liaison à l'ADN simple brin (BALF2), d'une primase (BSLF1) et de son facteur associé (BBLF2/3) et nécessite aussi la présence du facteur immédiat précoce EB1 (**Juillard et al., 2012**).

Les gènes définis comme précoces codent essentiellement des protéines ayant un lien avec la réplication du génome viral mais d'autres protéines ont aussi été décrites notamment la protéine EB2, le produit du gène BHRF1 et le produit du gène BcRF1.

EB2, produite à partir de l'ORF BMLF1, est une protéine précoce du cycle productif d'EBV. Cette protéine interagit avec l'ARN et permet l'accumulation cytoplasmique de certains ARN messagers viraux précoces et tardifs produits à partir de gènes dépourvus d'intron. La protéine EB2 est indispensable à la formation de nouveaux virions, et en son absence certains ARNm viraux précoces et la plupart des tardifs sont inefficacement exprimés. Enfin, en plus de son action sur la stabilisation et l'export des ARNm viraux, EB2 joue un rôle dans la traduction de ces ARNm (**Ricci et al., 2009 ; Juillard et al., 2012**).

BHRF1 est l'homologue fonctionnel viral du proto-oncogène BCL2 et protège les cellules B ainsi que les cellules épithéliales de la mort par apoptose durant le cycle productif. Récemment, il a aussi été montré que BHRF1 est exprimé durant la latence virale (**Kelly et al., 2009**).

La protéine BcRF1 est une protéine précoce du cycle productif d'EBV dont la fonction a récemment été découverte. En effet, BcRF1 est une TBP-like et est indispensable à l'expression des gènes tardifs. La protéine TBP (TATA-box Binding Protein) est la protéine cellulaire responsable de la formation du complexe de pré-initiation de la transcription sur les promoteurs cellulaires possédant une boîte TATA. La protéine BcRF1 est donc capable de se fixer, comme TBP, sur des séquences TATA, ainsi que sur des séquences TATT, séquences spécifiques de la plupart des gènes tardifs (**Gruffat et al., 2012**).

8-5-3- Les gènes tardifs :

La phase tardive est définie par l'expression des gènes tardifs codant essentiellement pour des protéines structurales du virus d'Epstein-Barr (protéines de capsid, protéines du tégument, glycoprotéines d'enveloppe). Les gènes tardifs d'EBV sont traditionnellement définis comme les gènes exprimés après la réplication de l'ADN. C'est pourquoi l'utilisation de l'acyclovir et du ganciclovir, deux analogues nucléotidiques bloquant la réplication de l'ADN viral, inhibe l'expression des gènes tardifs et bloque donc la production de nouvelles particules virale. Certains gènes tardifs peuvent cependant être exprimés indépendamment de la réplication de l'ADN. Un grand nombre de gènes cellulaires, transcrits par l'ARN polymérase II, présente dans leurs promoteurs une séquence TATA sur laquelle est recrutée la protéine TBP qui permettra la formation du complexe de pré-initiation. Alors que les promoteurs des gènes très précoces et précoces possèdent cette séquence TATA, les promoteurs de la plupart des gènes tardifs possèdent en lieu et place de la boîte TATA une séquence consensus TATT

À la fin de la phase tardive les concatémères linéaires d'ADN viral issus de la réplication sont clivés au niveau des régions TR pour former des unités d'ADN viral qui sont ensuite empaquetées dans les virions. La phase tardive de l'infection aboutit à la production de nouvelles particules virales (Serio *et al.*, 1998 ; Johannsen *et al.*, 2004).

9- Mécanismes de défense immunitaire :

La défense immunitaire consiste en une réponse innée non spécifique, composée entre autres par les phagocytes, les cellules NK, le système du complément et l'interféron, ainsi qu'en une réponse adaptative spécifique composée par les lymphocytes T cytotoxiques CD8+ et les anticorps produits par les lymphocytes B (Mossman *et al.*, 2005 ; Chaplin, 2006).

9-1- Réponse innée :

Le système immunitaire inné fournit la première ligne de défense contre l'invasion par des pathogènes, tel l'infection virale par EBV. Cette réponse non spécifique qui se manifeste rapidement s'exerce de la même façon quel que soit l'antigène. Les neutrophiles sont généralement les premières cellules à migrer au site d'infection et à rencontrer les pathogènes, mais obtiennent rapidement l'aide des monocytes suite à leur recrutement dans le foyer infectieux. Les neutrophiles et les macrophages sont des cellules phagocytaires qui exercent un rôle crucial dans la défense de l'hôte, notamment lors de l'immunité non spécifique, puisqu'ils reconnaissent, ingèrent et détruisent, par phagocytose, différents pathogènes. Les récepteurs de surface des neutrophiles et des macrophages permettent de reconnaître la structure conservée des molécules de pathogènes et de les différencier des molécules de l'hôte, sans avoir besoin d'une exposition préalable à un antigène spécifique. Les neutrophiles peuvent lyser les bactéries et les virus ingérés par les enzymes lytiques présentes dans leurs granules, alors que les monocytes peuvent présenter les antigènes phagocytés aux cellules T CD4+ dans les organes lymphoïdes secondaires. Outre leur fonction phagocytaire, les neutrophiles et les macrophages peuvent également sécréter d'importants médiateurs de l'inflammation, dont les cytokines et les chimiokines pouvant interférer avec la réplication virale et entraîner une défense anti-EBV. Les molécules antivirales comme l'interféron de type 1 contribuent de plusieurs manières à la défense antivirale, notamment en activant les cellules NK. Ces cellules ont aussi la capacité d'éliminer les cellules infectées en l'absence de sensibilisation antigénique antérieure. Le système du complément, un composant essentiel de l'immunité innée et exerce quatre fonctions différentes, soit lyser les cellules infectées, faciliter la phagocytose, augmenter la réaction inflammatoire et attirer les phagocytes par chimiotactisme (Mossman *et al.*, 2005 ; Chaplin, 2006).

9-2- Réponse adaptative :

Cette première ligne de défense non spécifique entraîne cependant une efficacité limitée. En conséquence, l'infection par EBV déclenche ensuite une réponse immunitaire adaptative, soit une réponse à médiation cellulaire impliquant la reconnaissance d'un antigène présenté par les molécules du CMH. La réponse à médiation cellulaire comprend une réponse humorale, qui fait intervenir des anticorps synthétisés et sécrétés par les lymphocytes B, et une réponse cytotoxique T. L'immunité à médiation cellulaire exerce un rôle indispensable dans le contrôle des infections virales. Le contrôle complet de la prolifération des lymphocytes B, et particulièrement la prolifération des cellules cancéreuses EBV positives, est possible par l'apparition de la réponse cytotoxique T. Les lymphocytes T qui n'ont encore jamais rencontré d'antigènes sont appelés lymphocytes T naïfs. Ils circulent dans le sang, la lymphe et les organes lymphoïdes secondaires à la recherche d'antigène spécifique présenté par les Cellules Présentatrices d'Antigènes (CPA), tels les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes B. Si aucun contact spécifique n'a lieu, les lymphocytes T naïfs quittent l'organe lymphoïde secondaire et retournent dans la circulation et migrent vers d'autres tissus lymphoïdes. Cependant, lorsqu'un lymphocyte T naïf reconnaît un antigène, il arrête sa migration et reste attaché à la CPA dans l'organe lymphoïde. Ce contact permet l'échange de signaux et déclenche la prolifération, la stimulation et la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices capables de combattre l'infection. Il existe deux populations de lymphocytes T : les lymphocytes T auxiliaires exprimant le CD4 et les lymphocytes T cytotoxiques exprimant le CD8. Les lymphocytes T CD8⁺ provoquent la destruction des cellules infectées par la libération de perforines et de granzymes, protéines cytotoxiques induisant l'apoptose, et contrôlent également la réactivation des infections latentes. D'autre part, les lymphocytes T CD4⁺ contribuent à l'activation des cellules CD8⁺ et stimulent aussi les lymphocytes B présents dans les organes lymphoïdes secondaires afin qu'ils produisent des anticorps. Effectivement, suite à l'infection de l'organisme par EBV, une réponse humorale est également déclenchée par l'apparition d'anticorps dirigés contre plusieurs protéines virales latentes et lytiques. En fait, cette infection virale induit l'expansion clonale des lymphocytes B en plasmocytes, cellules sécrétrices d'anticorps. Ces anticorps sont dirigés principalement contre la glycoprotéine gp350. Les cellules T effectrices et les plasmocytes possèdent une durée de vie limitée puisque la majorité d'entre elles entre en apoptose une fois que l'antigène est éliminé. Toutefois, certaines cellules persistent suite à l'élimination de l'antigène et celles-ci deviennent les cellules mémoires. Elles constituent la base de la mémoire immunologique fournissant ainsi une réponse plus rapide et plus efficace lors d'une deuxième rencontre avec le même pathogène (Landais *et al.*, 2005 ; Mossman *et al.*, 2005).

10- Principales pathologies associées à EBV :

L'EBV est associé à un très large spectre de pathologies bénignes et malignes. L'expression des protéines virales dans les tissus infectés conduisent à des altérations cellulaires qui contribuent à ces pathologies. Cependant la question qui se pose concerne le rôle joué par le virus (i) déclenchant, (ii) facilitant ou (iii) un simple passager dans ces pathologies ?

10-1- Infection primaire et pathologies :

L'EBV est présent à l'état latent, de manière endémique, dans toutes les populations humaines: environ 90 % des individus adultes présentent des anticorps contre ce virus. La primo-infection par l'EBV a lieu généralement pendant l'enfance, le plus souvent asymptomatique. L'infection par l'EBV est d'autant plus précoce que les conditions d'hygiène sont précaires. En revanche, environ un tiers des adolescents développent une MNI lors de leur premier contact avec l'EBV. La MNI survient majoritairement chez l'adolescent ou le jeune adulte entre 16 et 25 ans, avec une période d'incubation de 30 à 50 jours. C'est une maladie caractérisée par une prolifération poly-clonale de lymphocytes B infectés suivie de l'apparition de grandes cellules T cytotoxiques spécifiques de l'EBV. La relation entre la MNI et l'infection par l'EBV, découverte fortuitement en 1967, a été confirmée en 1974 (Young et al., 2004).

10-2- Infection persistante et pathologies tumorales :**10-2-1-Le Carcinome du cavum :**

Le carcinome du rhinopharynx (cavum) est une tumeur maligne d'origine épithéliale. Ce type de cancer est relativement peu présent dans la population caucasienne mais est très fréquent dans certains pays du Sud-est de l'Asie (Chine, Indonésie, Viêt-Nam) et d'Afrique du Nord (Tunisie,...). Son incidence dans ces régions peut être influencée par des facteurs environnementaux comme des habitudes alimentaires ou culturelles (méthodes de conservation des aliments,...). Ce carcinome est caractérisé par des cellules carcinomateuses indifférenciées associées à un important infiltrat lymphocytaire. Ces cellules présentent une latence virale de type II (EBER, BART, EBNA1, LMP1 et LMP2) (Williams et Crawford, 2006).

10-2-2- Le Lymphome de Burkitt :

L'EBV a été découvert dans des cultures de cellules tumorales issues de patients atteints de lymphomes de Burkitt (LB). Il s'agit d'un lymphome malin non hodgkinien de haut grade.

La cellule lymphomateuse a pour origine un lymphocyte B et est caractérisée par la présence d'une translocation du gène *c-MYC* (chromosome 8) au niveau du locus de gènes codant des immunoglobulines (chaîne lourde ou chaîne légère, sur les chromosomes 2, 14 et 22). Ces translocations chromosomiques conduisent à la surexpression de *c-MYC*. Ces cellules présentent une latence de type I restreinte à l'expression d'EBNA1 (**Williams et Crawford, 2006**).

10-2-3-Le Lymphome de Hodgkin :

Les lymphomes Hodgkiniens (LH) représentent environ 30 % des lymphomes et les 2/3 sont associés à l'EBV. Le LH est une pathologie néoplasique caractérisée par la présence de cellules géantes appelées cellules de Reed-Sternberg et la désorganisation de l'architecture ganglionnaire. Ces cellules de grande taille binucléées constituent 2% de la masse tumorale qui est surtout constituée de cellules infiltrées non cancéreuses. De plus, elles présentent une latence virale de type II avec l'expression d'EBNA1, LMP1 et LMP2 (**Kapatai et Murray, 2007**).

10-2-4-Syndrome Lymphoprolifératif Post-Transplantation (SLPT) :

Le SLPT se comporte comme un lymphome agressif et sont parmi les complications les plus graves de l'immunosuppression à long terme chez les personnes qui ont eu une greffe d'organe. Le SLPT se manifeste chez environ 1 à 2 % des personnes qui ont eu une greffe d'organe et peut aussi apparaître après une allogreffe de cellules souches, en particulier si on a administré des cellules souches dépouillées d'un grand nombre de lymphocytes T (déplétion en lymphocytes T). Le SLPT est presque toujours lié à un virus associé au lymphome, soit le virus EBV, la plupart des SLPT sont des lymphomes B. Environ 12 à 14 % des SLPT sont des lymphomes T. Le cancer s'est souvent propagé à des organes ou à des tissus à l'extérieur des ganglions lymphatiques. Des sièges extra ganglionnaires courants sont les poumons et le tube digestif. Le SLPT se propage aussi au système nerveux central dans certains cas (**Williams et Crawford, 2006**).

10-2-5-Autres cancers :

D'autres pathologies malignes sont associées à l'EBV, notamment : des carcinomes de type lympho-épithéliome, certains carcinomes gastriques, des désordres lympho-prolifératifs des cellules T, des tumeurs associées aux cellules dendritiques folliculaires, et quelques carcinomes hépatiques et mammaires. Ces pathologies ont en commun le fait que la présence de l'EBV n'y représente qu'un événement rare, mais si l'infection a lieu, l'expression des gènes viraux peut conduire à la tumorigenèse via de nombreuses voies de signalisation que l'on rencontre dans les lymphomes B (**Williams et Crawford, 2006**).

10-3- EBV et pathologies auto-immunes :

L'EBV a été associé à différentes maladies auto-immunes à plusieurs reprises depuis les années 70. Pour la sclérodémie généralisée (SG) et le LED, il y a une évidence séro-épidémiologique d'une association, plus marquée chez les jeunes en raison de la prévalence généralement plus faible de l'EBV. James et al., dans leur étude de contrôle de cas chez des enfants et jeunes adultes ayant un LED, ont trouvé une séoprévalence EBV de 99%, alors que 70% seulement des témoins étaient EBV-positifs (OR 50; $p < 10^{-11}$). Ces chiffres sont semblables pour la SG chez les enfants, mais les collectifs et la signifiante sont inférieurs : 83 % de séropositivité EBV chez les patients, 42% chez les témoins ($p < 0,001$). Ces différences sont moins marquées chez les adultes, vu que même chez les témoins non malades, la séoprévalence EBV atteint > 90 %. Certains auteurs doutent même qu'il existe des patients ayant une SG confirmée et qui soient vraiment EBV-séronégatifs. Les personnes ayant fait une MI symptomatique à EBV ont en outre un risque 2 fois plus élevé d'avoir plus tard une SG. Ces associations épidémiologiques sont absentes dans l'AR (Alotaibi, et al.. 2004).

Il y a par contre dans l'AR, le LED et la SG, de très nombreuses études virologiques et immunologiques qui montrent chez ces patients une activité nettement plus marquée de l'EBV, avec plus de cellules B ayant une infection latente. Une réponse immunitaire spécifique contre l'EBV, cellulaire et humorale, parfois supprimée, parfois accentuée est décrite, et ceci indépendamment du traitement immuno-modulateur. Il n'a pas encore pu être exclu que l'hyperactivité inflammatoire dans ces différentes maladies auto-immunes soit responsable de l'hyperactivité de l'EBV, ni de la défense immunitaire pathologique contre l'EBV. La question cruciale de ce que sont l'étiologie et l'effet n'a donc pas encore trouvé sa réponse définitive (Lossius et al., 2012 ; Pakpoor et al..2013).

11- Diagnostic biologique de l'infection par l'EBV :

Selon le type de prélèvement et l'objectif recherche le diagnostic de l'infection à EBV peut se faire soit par culture, ou par des méthodes sérologiques, soit par la PCR ou par hybridation. Toutefois, il n'existe pas de méthode standardisée et des résultats discordants sont parfois rapportés. Il n'existe pas non plus d'unanimité sur le prélèvement. Par contre, la recherche dans les cellules mononuclées du sang périphérique ou du sang total semble préférable à la recherche dans le plasma (Dehee et al., 2001).

11-1- Tests sérologiques (détection des anticorps) :

L'analyse des marqueurs sérologiques permet le diagnostic de primo-infection EBV dans la majorité des cas. En effet, la cinétique de différents anticorps permet de dater l'infection. Les anticorps anti capside (VCA) de classe IgM (anti-VCA-IgM) apparaissent environ 15 jours après le contact infectieux tandis que les IgG de même spécificité apparaissent quelques jours après. Ils sont présents dans la majorité des cas au moment de l'apparition des signes cliniques qui surviennent après une incubation d'environ 1 mois. Les anticorps anti-EBNA 2 apparaissent précocement et sont détectés chez 30 % des patients au moment de l'apparition des symptômes. Les anticorps anti-EA (IgG et IgA) sont souvent présents lors de la phase aiguë tandis que les anticorps anti-EBNA 1 apparaissent plus tardivement. Au décours de l'infection les anticorps anti-VCA et anti-EBNA persistent tandis que les anticorps anti-EA disparaissent. Ces derniers peuvent être détectés lors des réactivations virales.

De nombreux réactifs permettant la détection des différents anticorps sont commercialisés. La méthode de référence reste l'immunofluorescence (IF) (immunofluorescence indirecte pour les anticorps anti-VCA et anti-EA ou immunofluorescence anti-complémentaire pour les anticorps anti-EBNA) réalisée sur des cellules exprimant les antigènes VCA, EA ou EBNA. Seul un pourcentage des cellules expriment ces antigènes ; la qualité des lames est variable et la lecture parfois difficile. Dans le cas de l'antigène EBNA plusieurs antigènes EBNA sont exprimés, en particulier EBNA 1 et 2 ; les anticorps anti EBNA2 apparaissent précocement au cours de l'infection et les anticorps anti-EBNA1 sont plus tardifs. Des cellules exprimant uniquement EBNA1 ont été développées par transfection mais ne sont pas commercialisées.

Les techniques ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) sont de plus en plus utilisées ; la préparation des antigènes est très variable, antigènes natifs à partir de cellules infectées ou protéines recombinantes ou peptides. Les tests sont développés le plus souvent par comparaison avec les techniques d'IF ; toutefois des discordances sont observées en fonction des réactifs utilisés, des immunoblots ont été développés. Ils permettent la détection simultanée de différents anticorps et les résultats sont corrélés à ceux obtenus par IF, la détermination de l'avidité des anticorps est intéressante car une faible avidité est caractéristique d'une infection récente ; toutefois cette technique est mal standardisée et la détermination du seuil de l'index d'avidité reste à définir.

La détection des anticorps hétérophiles, anticorps de classe IgM dirigés contre des hématies de bœuf ou cheval, après adsorption de l'antigène Forsman sur extrait de rein de cobaye, est simple et permet donc un diagnostic rapide de primo-infection EBV. Ces anticorps peuvent persister 6 à 12 mois. Toutefois ils sont inconstants : présents chez 85 à 90 % des adolescents infectés, plus rarement chez le jeune enfant et le sujet âgé.

De plus, ils sont présents chez 2 à 3% des patients avec une pathologie auto-immune. Ils témoignent de la stimulation poly clonale associée à l'infection EBV. Même s'ils sont présents, le diagnostic de primo- infection EBV doit être confirmé par la recherche d'anticorps spécifiques (Svahn *et al.*, 1997 ; Hess, 2004).

11-2- Diagnostic moléculaire :

Repose aujourd'hui principalement sur :

- **La PCR** : actuellement, c'est la technique la plus utilisée et la plus sensible. Elle repose sur l'amplification des séquences génomiques conservées, ou de séquences répétées.
- **Hybridation** : la détection du génome EBV peut également être effectuée par hybridation *in situ* qui offre l'avantage de pouvoir identifier le type et le pourcentage de cellules infectées. Cette opération s'effectue soit sur l'ADN génomique, soit sur l'ARN codant les EBERs. Les techniques de quantification moléculaire, destinées à évaluer la « charge virale » dans un tissu ou un liquide biologique, sont en cours d'évaluation. Elles sont effectuées après amplification de séquences nucléotidiques conservées et si possible uniques (Hess, 2004).

11-3- Mise en évidence du virus :

L'isolement du virus par culture cellulaire est difficile et aléatoire. Le développement de techniques de détection du génome a permis la mise en évidence fiable et facile du virus. Toutefois, il n'existe pas de méthode standardisée et des résultats discordants sont parfois rapportés. Il n'existe pas non plus d'unanimité sur le prélèvement : la recherche dans les cellules mononuclées du sang périphérique ou du sang total semble préférable à la recherche dans le plasma, le virus peut être retrouvé dans d'autres sites : sa présence dans le liquide céphalo-rachidien est associée à une encéphalite ou à un lymphome cérébral, chez les patients porteurs d'un lymphome ou d'un carcinome du naso-pharynx la recherche du génome viral et de transcrits viraux est réalisée dans la lésion permettant de préciser le type de cellules infectées grâce à des marquages cellulaires spécifiques (Dehee *et al.*, 2001).

Chapitre II

Le Lymphome de Burkitt

1- Définition et classifications :

Décrit en 1958 par *Burkitt* en Afrique centrale à Kampala (Ouganda), le LB est un Lymphome Malin Non Hodgkinien (LMNH) agressif (de haut grade de malignité) issu d'une prolifération monoclonale de cellules lymphoïdes B avec un temps de doublement très élevé. C'est la première pathologie maligne humaine dans laquelle le rôle étiologique d'un virus, l'EBV a été démontré. D'autres virus sont associés à des lymphomes chez l'homme : l'HTLV-1, l'HHV8, le VHC et le VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine). Il n'est pas resté longtemps limité au continent africain et très rapidement, des cas ont été rapportés en Europe et en Amérique. Il représente aujourd'hui 35 à 50 % des LMNH de l'enfant et 2 % de ceux de l'adulte (**Carpenter et al., 2008**).

Trois variants cliniques ont été décrits : une **forme sporadique**, une **forme endémique** et une **forme associée à une immunodéficience liée à l'infection par le VIH** : la forme endémique (aussi appelée LB africain) est observée en Afrique équatoriale, chez des enfants âgés de 4 à 7 ans (100 % EBV) qui présentent une masse mandibulaire. La forme sporadique (aussi appelée LB non endémique) n'a pas de répartition géographique particulière et représente seulement 1 à 2 % des lymphomes dans les pays occidentaux. Il atteint principalement les jeunes adultes avec une médiane d'âge de 30 ans et le principal symptôme est une altération de l'état général associée à une volumineuse masse « bulky » le plus souvent extra-nodale et typiquement abdominale provoquant des douleurs abdominales, des vomissements ou encore une obstruction intestinale. Ces deux variants présentent un risque élevé d'envahissement du système nerveux central (40 %) et de survenue d'un syndrome de lyse tumorale. Une atteinte médullaire y est présente dans environ 70 % des cas (**Armitage et al., 2006 ; Carpenter et al., 2008**).

Le LB lié à l'infection par le VIH se manifeste tôt dans la progression vers le sida. L'EBV n'est décelable que chez 30 à 40 % des LB porteurs du VIH. L'aberration chromosomique est constante. Le LB lié au sida a été rapporté en Occident. L'incidence est passée de 0,5 à 1 million en 1970 à 4,18 en 2008 aux USA, augmentation liée à l'émergence du Sida. Cependant, l'incidence de ce type de lymphome semble diminuer à cause du traitement antirétroviral. La présence de ces deux virus dans ce type de lymphome n'est pas un simple hasard. Il existe une relation épidémiologique entre la survenue du LB et l'infection virale. Les virus EBV et VIH peuvent interagir avec les lymphocytes B. Ils sont capables de stimuler et activer les lymphocytes B mais le rôle précis de ces virus dans la transformation lymphocytaire reste imparfaitement compris (**Brady et al., 2007**).

Sur le plan morphologique, le LB se présente sous la forme de cellules B monotones, de taille moyenne avec un envahissement diffus et un temps de doublement très élevé. Un aspect de « ciel étoilé » est décrit en raison des nombreux macrophages infiltrant la tumeur contenant des corps apoptotiques (**figure 9**).

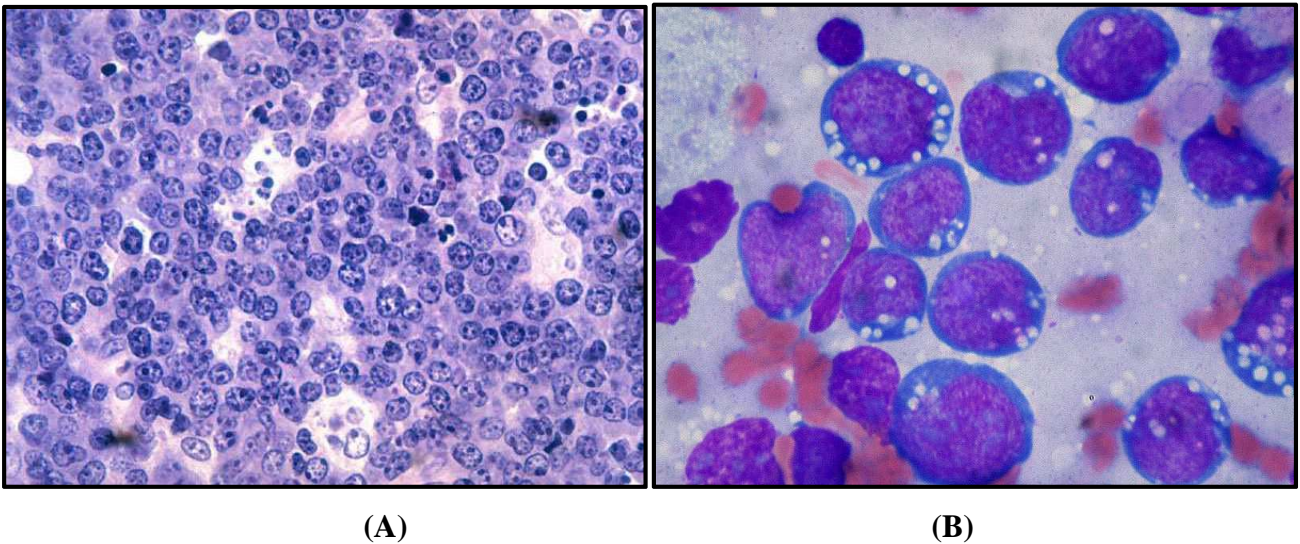


Figure 9 : Aspect cytologique du lymphome de Burkitt après coloration à l’Hematoxyline-Eosine (HE) (A) Grossissement x40, (B) Grossissement x100 (d’après Hummel et al., 2006).

L’immunophénotypage révèle une forte expression de l’IgM ainsi que des marqueurs B : CD19, CD20, CD22, CD10 et CD79a. L’expression du CD10 et de la protéine Bcl-6 est également présente dans ce type de lymphome, ce qui évoque une origine des cellules tumorales située au niveau du centre germinatif. Les cellules lymphomateuses n’expriment en revanche pas la protéine bcl-2.

En cytogénétique, l’altération la plus fréquente (80 %) est la translocation du gène *C-MYC* t(8;14)(q24;q32) et moins communément les translocations t(8;22)(q24;q11) (5 %) et t(2;8)(p12;q24) (15 %) (figure 10). Le plus souvent, le caryotype retrouve peu d’anomalies supplémentaires. Des études d’expression du profil génique ont mis en évidence une signature spécifique pour ces lymphomes (Dave et al., 2006 ; Hummel et al., 2006).

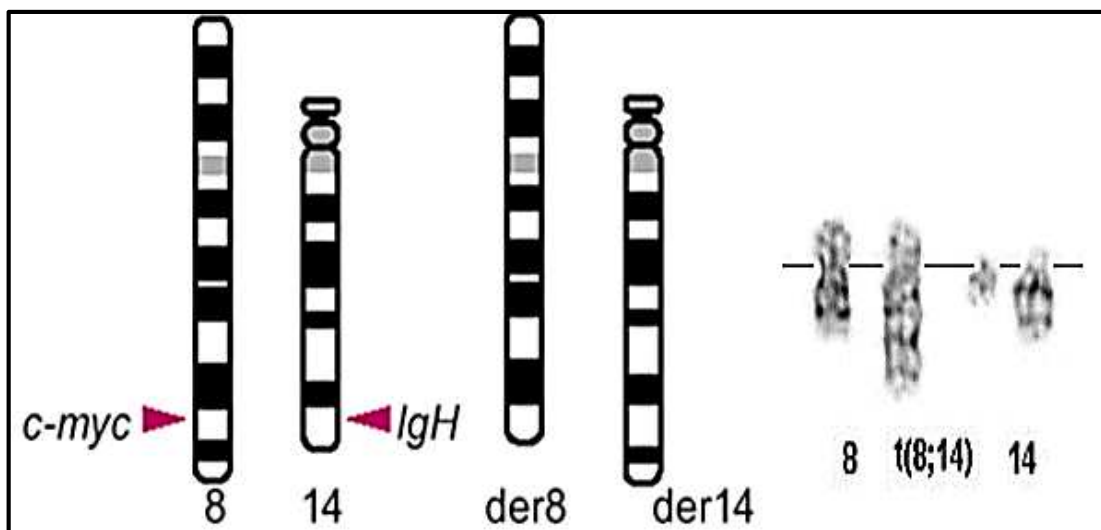


Figure 10 : Aspect cytogénétique du lymphome de Burkitt (Représentation schématique et coloration aux bandes G) (d’après Huret et al., 2004).

2- Épidémiologie :

Trois formes cliniques et épidémiologiques de LB sont aujourd'hui décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (**Brady et al., 2007**) (**figure 11**).

➤ **Une forme endémique** ; retrouvée principalement en Afrique équatoriale et en Papouasie-Nouvelle Guinée, dans des zones où la malaria est endémique. Elle survient essentiellement chez les enfants de 4 à 7 ans. Elle est prédominante chez les garçons avec un ratio homme/femme de 2/1. Cette forme de LB est très fortement associée à l'EBV (98 à 100 % des cas). Cliniquement, elle se manifeste par des tumeurs de la mâchoire mais également par des tumeurs de la cavité abdominale (reins, tractus gastro-intestinal et ovaires) (**Blum et al., 2004**).

➤ **Une forme sporadique** ; décrite dans le reste du monde et complètement indépendante des conditions climatiques et des zones géographiques. Elle représente 1 à 2 % des lymphomes de l'adulte et plus de 40 % des lymphomes de l'enfant aux USA et en Europe de l'ouest. Elle affecte majoritairement les jeunes hommes (ratio homme/femme de 2,3/1 aux États-Unis et de 3,7/1 en France). Elle est associée à l'EBV dans 15 à 20 % des cas. Cliniquement, cette forme de LB se traduit majoritairement par la présence de tumeurs abdominal (80 % des cas) (**Brady et al., 2007 ; Kelly et Rickinson, 2007**).

➤ **Une forme associée au syndrome d'immunodéficience** ; survenant chez les patients infectés par le VIH. Cette forme est associée avec EBV dans 30 à 40 % des cas. La plupart des LB associés à l'EBV présentent une latence de type I. Toutefois, certains cas de latence de type III ont également été observés (**Brady et al., 2007 ; Kelly et Rickinson, 2007**).

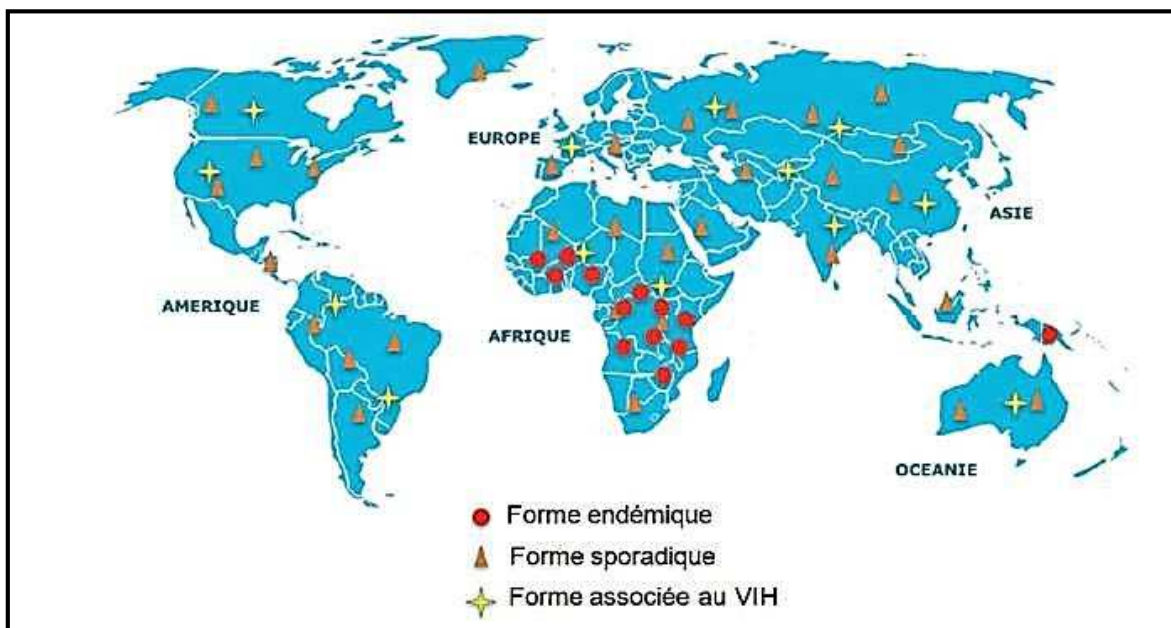


Figure 11 : Épidémiologie du lymphome de Burkitt : distribution géographique des différentes formes de LB (d'après **Brady et al., 2007**).

3- Physiopathologie du lymphome de Burkitt (mécanismes de la lymphomagenèse) :

En Afrique, la survenue du lymphome de Burkitt est le résultat de plusieurs infections qui se succèdent chez un individu ce qui aboutit à une stimulation excessive du système immunitaire, et plus précisément des lymphocytes B acteurs majeurs de l'immunité humorale. C'est ainsi qu'une infection par l'EBV est le plus souvent contractée à partir de la mère, puis un paludisme, sont susceptibles d'aboutir à la formation d'un lymphome de Burkitt. Il s'agit du paludisme à *Plasmodium falciparum*. De façon générale, l'apparition de la tumeur de Burkitt est le résultat de plusieurs infections successives du sujet, qui aboutissent à une stimulation exagérée de son système immunitaire, et plus spécifiquement des lymphocytes B (Brady et al., 2007; Kelly et Rickinson, 2007).

L'analyse des relations entre le lymphome de Burkitt et l'EBV, entre translocations chromosomiques spécifiques et sélection clonale, entre syndromes lympho-prolifératifs et déficit immunitaire, a conduit à proposer des schémas de développement tumoral, dans les quels translocation *C-MYC/Ig* et infection par l'EBV sont les étapes principales. L'événement moléculaire est maintenant considéré comme initial, selon le modèle suivant : expansion poly-clonale des cellules B, consécutive par exemple au paludisme en zone endémique ou à l'infection VIH, survenue d'une translocation chromosomique et dérégulation de *C-MYC*, puis immortalisation des cellules B transloquées par l'EBV (Dave et al., 2006 ; Dang, 2012).

3-1- Le facteur de transcription *C-MYC* et EBV :

C-Myc comporte un domaine N-terminal activateur, qui interagit avec le complexe de transcription de l'Acide Ribo-Nucléique (ARN) polymérase, un domaine bHLH-leucine zipper qui sert à la dimérisation avec d'autres protéines, et un domaine C-terminal capable de se lier à une séquence hexamérique de l'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN) 5'-CACGTG-3' (élément central E-box). *C-Myc* est un trans-activateur surexprimé dans un grand nombre de cancers et exerce sa fonction en se dimérisant avec MAX puis en se fixant à une séquence d'ADN spécifique appelée « E-box » à l'aide de co-facteurs (figure 12) (Vita et Henriksson, 2006).

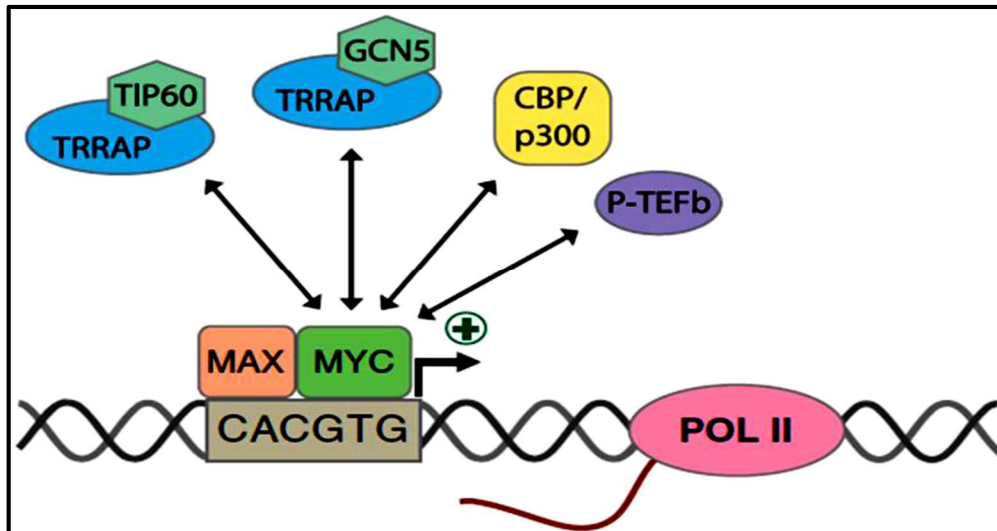


Figure 12 : Activité transcriptionnelle de C-MYC (d'après Klapproth et Wirth, 2010).

Des translocations sont responsables de la surexpression du gène *C-MYC* dans les LB, en juxtaposant la région codante de *C-MYC* à des régions enhancers des gènes des *Ig* qui ont une fonction trans-activatrice, et qui vont permettre la synthèse de la protéine C-Myc à un taux très élevé dans les tumeurs. Certains gènes sont directement régulés par C-Myc. Plusieurs sont surexprimés : Cycline D2 qui permet la progression du cycle cellulaire, *TRAP1* (Tumor necrosis factor Receptor Associated Protein 1) qui favorise l'apoptose, *LDH-A* (Lactate DesHydrogenase A gène) qui favorise le métabolisme cellulaire ou encore *TERT* (TElomerase Reverse Transcriptase) qui par l'induction des télomérases joue un rôle dans l'immortalisation cellulaire. Cette prolifération anormale est aussi associée à un blocage de différenciation cellulaire par la répression des gènes *gas1* ou *gadd45*, dans lequel C-Myc joue aussi un rôle essentiel, ou encore la répression de LFA-1 (Leucocyte Function associated Antigen-1) jouant un rôle dans l'adhésion cellulaire et la reconnaissance cellulaire par le système immunitaire. D'autres signaux sont indirectement régulés par C-Myc, notamment l'augmentation de la protéine P53, via la surexpression d'*ARF*, qui permet le relargage de cytochrome C et l'apoptose. C-Myc est également impliqué dans la régulation de l'expression (par répression ou activation) de plusieurs mi-ARN ayant un rôle dans l'apoptose, la prolifération et le métabolisme cellulaire tels que miR 17-92, miR 26a, miR 23 a/b (**figure 13**).

Dans les lignées lymphocytaires, la surexpression isolée d'une protéine C-Myc normale ne suffit pas à induire une tumeur maligne. D'autres partenaires cellulaires semblent nécessaires pour conférer un phénotype malin aux précurseurs cellulaires tumoraux responsables des LB. Cependant, il n'y a pas de partenaire de C-Myc identifié actuellement et systématiquement présent, qui jouerait un rôle initiateur dans la lymphomagenèse des LB (**Kamranvar et al., 2007 ; Kelly, 2009**).

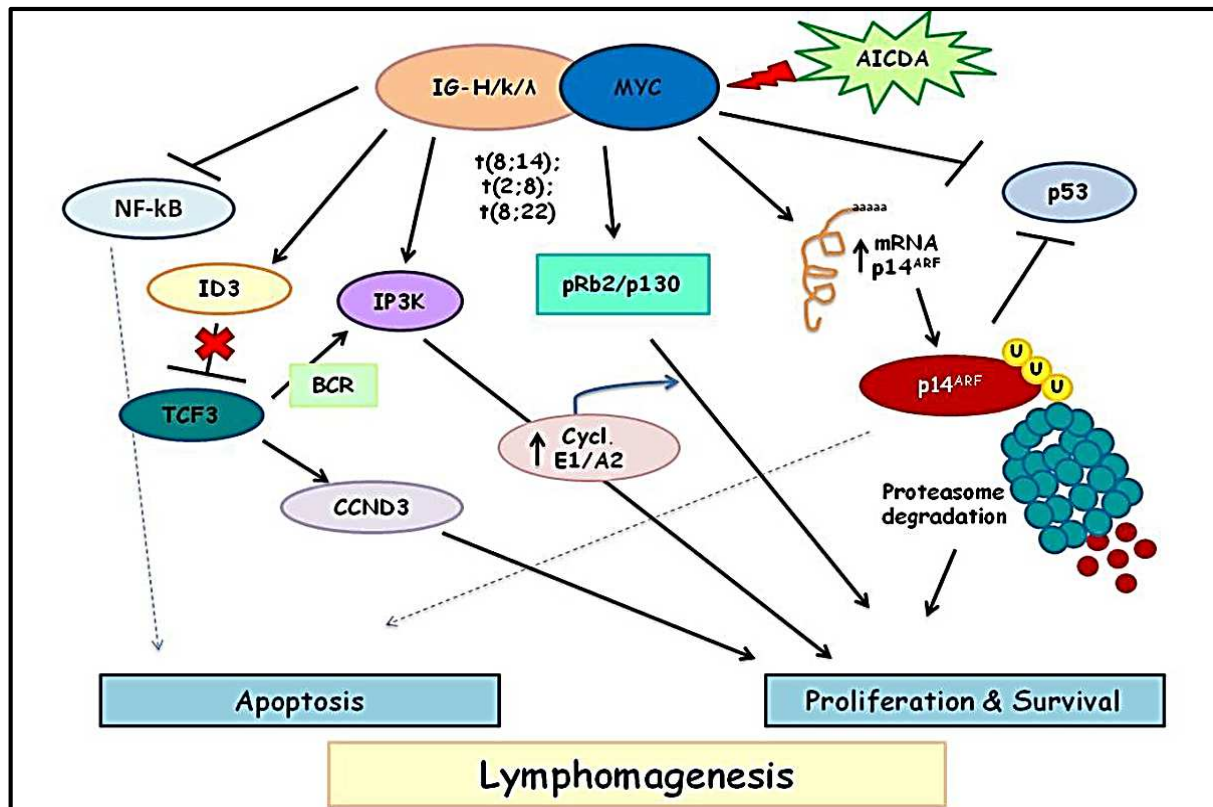


Figure 13 : Mécanismes moléculaire de la lymphomagenèse (d’après Klapproth et Wirth, 2010).

MYC joue un rôle central dans le contrôle de la prolifération des cellules normales en favorisant leur engagement et leur maintien dans le cycle cellulaire et en conservant l’intégrité des télomères par augmentation de l’activité de la télomérase. La dualité fonctionnelle de MYC suggère que l’effet oncogénique observé *in vivo* est le résultat d’un équilibre entre ses effets prolifératifs et pro-apoptotiques. La survie de cellules dont l’expression de *C-MYC* est augmentée passe donc par l’acquisition d’anomalies additionnelles anti-apoptotiques. MYC fonctionne à la fois comme un activateur et un inhibiteur de la transcription participant au contrôle du cycle cellulaire et de l’apoptose.

Le rôle de l’EBV dans les LB a depuis toujours fait l’objet de nombreux travaux. La découverte de ce virus est en effet intimement liée à cette tumeur, puisque c’est grâce à une lignée de LB que le virus a été isolé. Le rôle de l’EBV est certainement majeur dans la forme endémique de la maladie (où il est présent dans plus de 90 % des cas), mais probablement pas dans la forme sporadique des pays occidentaux ou dans la population infectée par le VIH, car il n’est retrouvé que dans 30 à 40 % des lymphomes observés dans ces deux groupes de patients. Dans tous les cas de LB où l’EBV est présent, celui-ci est sous forme épisomique et monoclonale. Le fait que le virus soit monoclonal confirme que l’infection survient donc au tout début de l’expansion de cellules du LB. Par la suite ou de façon concomitante, vont se produire d’autres événements cellulaires responsables de l’apparition d’une tumeur maligne. Le rôle de l’EBV dans l’oncogenèse des LB n’est pas encore clairement élucidé (Paschos *et al.*, 2009).

Une hypothèse serait que l'EBV joue un rôle précoce dans l'expansion lymphoïde B, sans rôle clair sur la persistance du clone tumoral. *In vitro*, l'infection EBV entraîne une expansion poly-clonale de cellules B infectées exprimant un ensemble de protéines et notamment de LMP 1, 2A et 2B pouvant être responsables de transformation et surtout d'immortalisation. L'ensemble de ces facteurs pourrait ainsi favoriser l'apparition de réarrangements génomiques impliquant *C-MYC*, et donc être responsable de l'apparition d'un LB. De plus, toujours *in vitro*, l'EBV, par l'intermédiaire direct des protéines BHRF-1, EBNA 1 et EBER ou par la répression de protéines pro-apoptotiques (BIM) par le transcrit LMP1, pourrait aussi avoir un rôle facilitateur dans la transformation induite par C-Myc, en inhibant les voies d'apoptose sans interférer sur la prolifération cellulaire (Dave et al., 2006 ; Paschos et al., 2009).

3-2- Réarrangements de C-MYC :

Les altérations cytogénétiques les plus décrites sont des translocations chromosomiques mais il existe aussi des mutations affectant la séquence régulatrice ou la région promotrice ainsi que des amplifications du gène avec augmentation du nombre de copies. La translocation la plus fréquente et la mieux connue est celle impliquant le locus de *C-MYC* (8q24) et la chaîne lourde de l'Ig *IGH* sur le chromosome 14. Moins communément, le locus de *C-MYC* peut avoir pour partenaire la chaîne légère *lambda* de l'Ig (22q11) ou *kappa* (2p12).

Les points de cassure impliquant les loci de *C-MYC* et de l'*IGH* sont la conséquence d'une activité aberrante de l'AICDA (Activation-Induced Cytidine Deaminase) et non de RAG1/2 (Recombination Activation Gene). Ces points de cassures proviennent d'une hyper-mutation somatique ou d'une recombinaison des classes déféctueuse. Cependant, la translocation *C-MYC-IG* peut être détectée dans des conditions non néoplasiques, ce qui laisse à penser que d'autres facteurs sont nécessaires pour la transformation maligne (Vita et Henriksson, 2006 ; Dang, 2012).

Les différents points de cassure sur le chromosome 14 suggèrent que les événements moléculaires observés dans les lymphomes endémiques et sporadiques surviendraient à des étapes différentes lors de la différenciation lymphoïde B. Dans la forme endémique, le type de réarrangement suggère que celui-ci se produit lors de la recombinaison VDJ (pré-germinatif), alors que dans les formes sporadiques, celui-ci surviendrait lors des mutations somatiques de la région IgH, signant le passage par le centre germinatif des cellules lymphoïdes B. Cette observation pose la question du stade précis de différenciation cellulaire de la cellule normale dans laquelle la transformation se produit (cellule B immature ou du centre germinatif) (Vita et Henriksson, 2006 ; Dang, 2012) (figure 14).

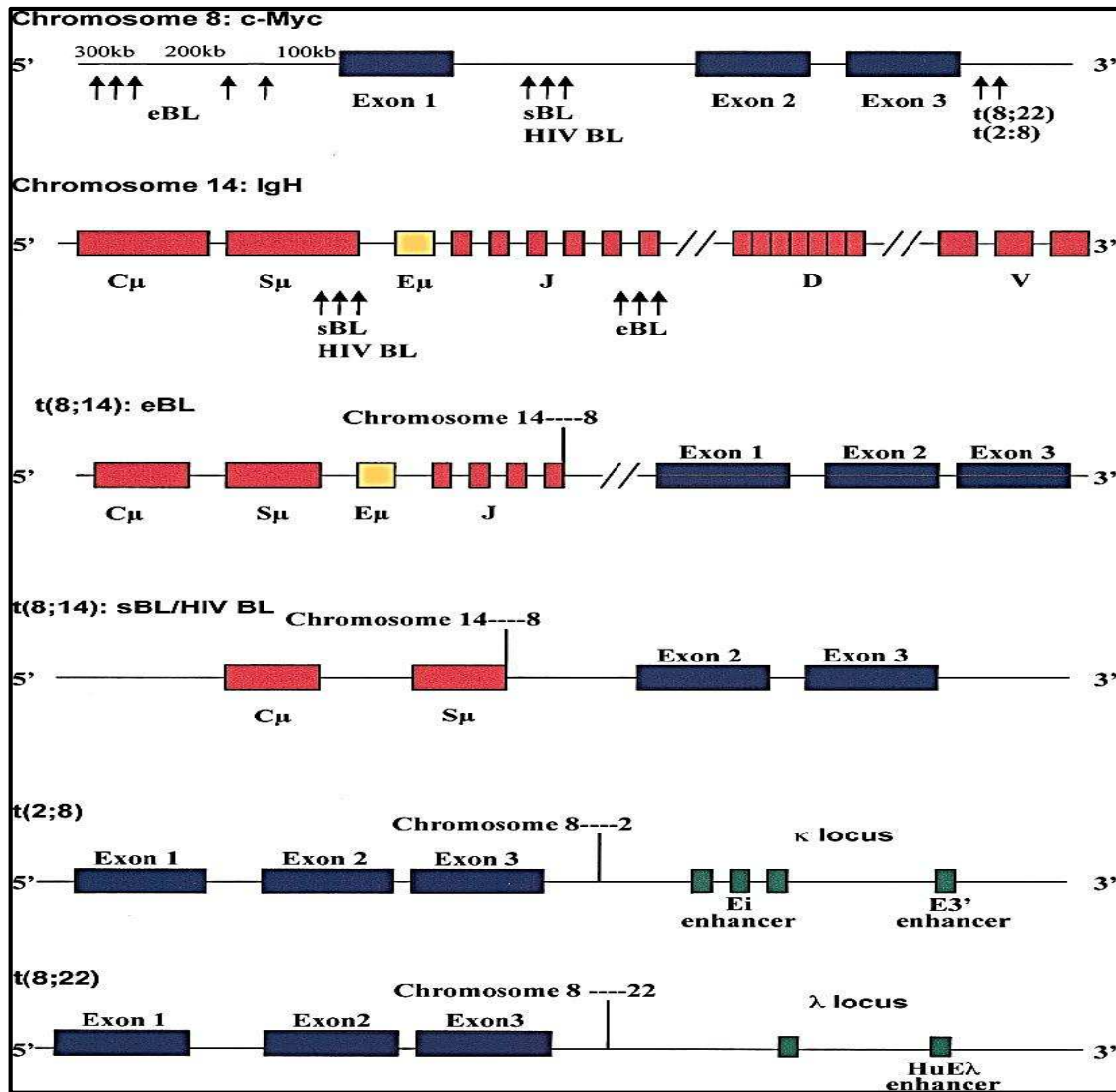


Figure 14 : Localisation des points de cassure sur le gène *C-MYC* et sur les loci *IG* lors du lymphome de Burkitt chez l’homme (d’après Blum et al., 2004).

4- Diagnostic :

Les manifestations cliniques du LB sont analogues à celles de la maladie de Hodgkin avec des signes généraux (anémie, fièvre inexplicée, sueurs nocturnes, asthénie et perte progressive du poids), des adénopathies superficielles (dans 2/3 des cas, fermes, indolores, adhérent aux tissus, cervicales, inguinales et axillaires), des adénopathies profondes (retro-péritonéales, mésentériques et pelviennes). D’autres localisations sont rares (hépatique, splénique, osseuses, cutanées, gastro-intestinales multiples). Le mode de révélation est ganglionnaire dans 2 /3 des cas et extra-ganglionnaire dans 1/3 des cas : la fréquence des localisations extra-ganglionnaires primitives ou secondaires est une particularité importante pour le pronostic. Les localisations anatomiques initiales sont : abdominale 70 à 90 %, 10 % maxillaire et exceptionnellement cutanée, osseuse, épidurale ou intra cérébrale. L’atteinte neuro-méningée représente 20 % (Shah, 2014).

Le diagnostic de certitude repose sur l'analyse cyto-histologique d'une biopsie ganglionnaire, d'une masse tumorale superficielle ou profonde guidée sous scanner, éventuellement d'une lésion endoscopique accessible à l'endoscopie, voire d'une tumeur abdominale prélevée lors d'une laparotomie de nécessité dans le contexte d'une occlusion.

Une atteinte médullaire doit être recherchée plutôt par ponction médullaire que par biopsie. En effet, l'analyse cytologique d'un frottis médullaire est souvent plus sensible que l'étude histologique pour identifier une infiltration minoritaire. De plus, la détection sur le myélogramme de blastes hyper-basophiles contribue au diagnostic et peut éviter des investigations chirurgicales à visée biopsique, dans le cas de tumeurs profondes ou extra nodales. L'examen du liquide céphalo-rachidien est systématique.

La valeur des LDH, de l'uricémie, et de l'uraturie, reflet de la masse tumorale et de cinétique de prolifération doit être précisée. Enfin, certains troubles métaboliques, liés à la lyse cellulaire, tels qu'une hyperkaliémie, une hyper-phosphorémie, une insuffisance rénale, une acidose lactique seront recherchés prévenus lors de l'induction thérapeutique.

Dans le contexte d'une infection VIH, la connaissance des éventuelles manifestations cliniques qui ont précédé la survenue du lymphome de Burkitt, le compte de lymphocytes CD4+ circulant, permettent d'évaluer le statut immunitaire du patient (**Hummel et al., 2006**).

5- Pronostic et traitement :

Le LB est un lymphome très agressif mais à haut potentiel de curabilité. L'utilisation des chimiothérapies intensives actuelles permet d'obtenir des taux de réponse complète de l'ordre de 90 % dans les stades localisés et de 60 à 80 % dans les stades disséminés malgré les atteintes médullaires ou du système nerveux central. L'absence de réponse complète et les rechutes qui surviennent principalement la première année sont des facteurs de très mauvais pronostic. Il existe peu de facteurs pronostiques cliniques, les plus reconnus étant l'envahissement médullaire ou du système nerveux central, l'âge, la présence de cellules circulantes, l'anémie, l'altération de l'état général, une masse supérieure à 10 cm et un taux de LDH élevé. L'évaluation du stade peut se faire grâce à la classification d'*Ann Arbor* ou plus spécifiquement par la classification de *Murphy* (**tableau II**). Enfin, sur le plan cytogénétique, la présence d'anomalies additionnelles et notamment la présence de délétion du bras long du chromosome 13 confèrent un mauvais pronostic) (**Shah, 2014**).

Tableau II : Stadification de *Murphy* des lymphomes de Burkitt (d'après *Dave et al., 2006*).

Stade	Description
Stade I	Une localisation unique, ganglionnaire ou extra-ganglionnaire, en dehors de l'abdomen ou du médiastin.
Stade II	Une localisation digestive unique (le plus souvent de la région iléo-caecale) sans ou avec atteinte du premier relais ganglionnaire mésentérique, extirpable de façon segmentaire ou deux (ou plus) localisations ganglionnaires et/ou extra-ganglionnaires du même côté du diaphragme.
Stade III	Localisations ganglionnaires et/ou extra-ganglionnaires de part et d'autre du diaphragme, ou tumeur primitive intra-thoracique, ou localisation abdominale étendue, ou tumeur para-spinale ou épidurale.
Stade IV	Atteinte médullaire et/ou du système nerveux central.

Le traitement du LB est une urgence thérapeutique. Les deux complications qui doivent impérativement être anticipées sont la compression d'organe vital et le syndrome de lyse tumorale.

Le traitement du LB est, dans les pays développés, basé sur les protocoles LMB (Lymphome Malin B, un protocole français de traitement des lymphomes B), protocoles en constante évolution. Il s'agit de protocoles de poly-chimiothérapie de type CHOP (Cyclophosphamide, Adriamycine, Vincristine, Prednisone) ou ACVBP (Adriamycine, Cyclophosphamide, Vindésine, Bléomycine, Prednisone) (**Shah, 2014**).

Constamment mortel sans traitement, le LB a vu son pronostic transformé au cours des dernières années. Les taux de rémission sont de 90 % pour le stade I, de 75 % pour le stade II, de 70 % pour les stades III et IV chez l'enfant sous poly-chimiothérapie. Les malades consultent en Afrique à un stade avancé de la maladie. Enfin, dans le LB lié au sida, l'emploi de protocoles lourds comprenant une poly-chimiothérapie et une cobaltothérapie crânienne prophylactique entraînent une réponse initiale toujours partielle, suivie d'une rechute avec atteinte du système nerveux, cause habituelle du décès. Le traitement du lymphome de Burkitt associe actuellement à la chimiothérapie un anticorps monoclonal, le rituximab (Rituxan[®]), avant chaque cycle tant chez les VIH négatifs que chez les VIH positifs (**Nelson et al., 2010**).

Partie Pratique

Techniques
de
diagnostic biologique
de l'EBV

La réalisation de la partie pratique du mémoire de Master a consisté en un stage de formation pratique pour une durée d'un mois au niveau de l'hôpital militaire Constantine. Ce stage a été axé sur les techniques de diagnostic biologique d'une infection virale par l'EBV. Deux approches sont utilisées dans cette structure d'accueil :

- **Le test EBV-EA IgG ELISA,**
- **Le test MNI FUMOUCHE®.**

I- Le test EBV-EA IgG ELISA :

1- Objectif :

C'est un test immuno-enzymatique pour le dosage qualitatif ou quantitatif des anticorps IgG dirigés contre l'antigène précoce (EA) du virus Epstein-Barr dans le sérum et plasma humains.

2- Principe du test :

Le principe des trousseles ELISA-Microplaques repose sur la capacité des substances biologiques, en l'occurrence des antigènes, à s'adsorber sur les surfaces en plastique telles que le polystyrène (phase solide). Le coffret Platelia™ EBV-EA-D IgG de la firme BIO-RAD (**figure 15**) se base sur la technologie ELISA et utilise des antigènes EBV-EA-D recombinants fixés sur la phase solide. Lors de la 1^{ère} étape de la réaction, ces antigènes, fixés au fond des puits de la microplaque, sont mis en contact avec le sérum du patient. Les anticorps spécifiques de ces antigènes, s'ils sont présents, se lient pour former des complexes antigène-anticorps. À la fin de l'incubation, l'excès d'anticorps et les protéines du sérum sont éliminés par des lavages. Lors de la 2^{ème} étape de la réaction, le conjugué, des anti-IgG humaine de chèvre marqués à la peroxydase de raifort, est ajouté et se lie spécifiquement aux complexes anticorps-antigènes présents. À la fin de l'incubation, le conjugué est éliminé par les lavages. L'addition de substrat Tétraméthyl-Benzidine (TMB) fait apparaître une coloration bleue si des anticorps spécifiques aux antigènes EBV-EA-D sont présents. Quand la réaction est arrêtée par une solution d'acide (H₂SO₄1N), le contenu du puits vire au jaune. L'intensité de cette couleur, proportionnelle à la concentration d'anticorps dans le sérum, peut être lue sur un spectrophotomètre approprié ou sur un lecteur de microplaques ELISA.

La limite de détection, la spécificité et la reproductibilité des dosages ELISA, sont comparables à d'autres tests d'anticorps sérologiques, tels que l'immuno-fluorescence, la fixation de complément, l'hémagglutination ou les radio-immuno-assays.

3- Composition de la trousse :

Tableau III : Composition de la trousse du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIO-RAD).

Etiquetage		Nature des réactifs	Présentation
			n
R1	Microplate	Microplaque : 12 Barrettes (8 puits) sensibilisée: par EBV-EA-D recombinant conservées dans un sachet avec un déshydratant	1
R2	Concentrated Washing Solution (20x)	Solution de lavage concentrée (x 20) : tampon Tris (pH 7,2 ± 0,2) contenant du Tween® 20 à 1%. Conservateurs: ProClin™ 300 (0,1%)	1 x 50 ml
R3	Non reactive control	Contrôle négatif (humain) non réactif vis-à-vis des IgG anti-EBV-EA-D, Négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC. Conservateurs : azide de sodium (< 0,1%) et pen/strep (0,01%)	1 x 0,4 ml
R4a	Positive Control I	Contrôle positif I [humain) réactif vis-à-vis des IgG anti-EBV-EA-D. Négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH 1, anti-VIH2 et anti-VHC. Conservateurs : azide de sodium (<0,1%) et pen/strep (0,01 °h)	1 x 0,4 ml
R4b	Positive Control II	Contrôle positif II (humain) réactif vis-à-vis des IgG anti-EBV-EA-D. Négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH 1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateurs: azide de sodium (<0,1%) et pen/strep (0,01 °h)	1 x 0,4 ml

R5	calibrator	Calibrateur (humain) réactif vis-à-vis des IgG anti-EBV-EA-D, avec le facteur spécifique de la trousse imprimé sur l'étiquette du flacon. Négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VIH, anti-VIH2 et anti-VHC. Conservateurs : azide de sodium (<0,1%) et pen/strep (0,01%)	1 x 0,4 ml
R6	Conjugate	Conjugué: Anticorps anti-IgG humaines (chèvre) marqués à la peroxydase de raifort Conservateurs: ProClin™ 300 (0,1%) et gentamycine	1 x 16 ml
R7	Diluent I	Diluent I : tampon prêt à l'emploi (pH 7,5 ± 0,2). Conservateurs: ProClin™ 300 (0,1%)	1 x 30 ml
R9	Chromogen TMB	Solution clé Chromogène / Substrat (prête à l'emploi) : Tetramethylbenzidine (TMB).	1 x 15 ml
R10	Stopping Solution	Solution d'arrêt (prête à l'emploi) : solution d'acide sulfurique 1 N	1 x 15 ml
		Feuille de travail	1

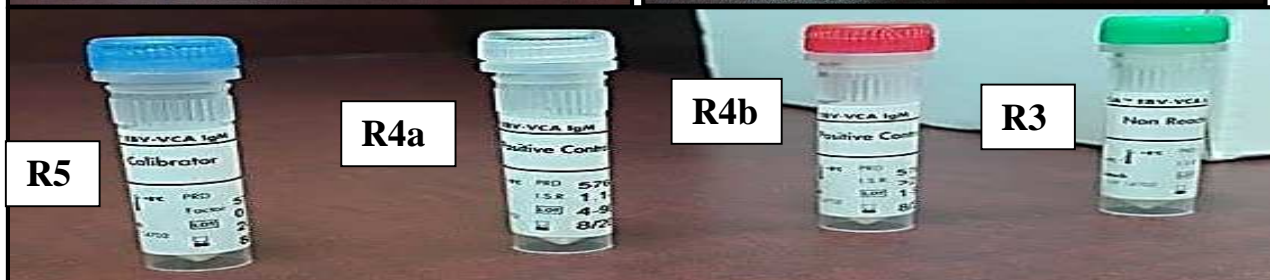




Figure 15 : Composition de la trousse du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIO-RAD).

4- Matériel nécessaire :

- Agitateur type vortex.
- Appareil de lecture pour microplaques (équipés de filtres à 450 nm).
- Conteneur de déchets contaminés.
- Hypochlorite de sodium et bicarbonate de soude.
- Eau distillée ou désionisée.
- Éprouvettes graduées.
- Gants à usage unique et lunettes de protection.
- Papier absorbant.
- Pipettes, multi-pipettes, automatiques ou semi-automatiques, réglables ou fixes pouvant distribuer 10, 100 et 1000 µl.
- Système de lavage, automatique, semi-automatique ou manuel pour Microplaque.
- Tubes à usage unique.

5- Reconstitution des réactifs, validité et conservation :

La trousse doit être gardée à +2 à 8°C. Chaque élément de la trousse conservé à cette température peut être utilisé jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret (sauf indication spécifique). Avant utilisation, on doit laisser tous les réactifs atteindre la température ambiante (+21 à 25°C). Après usage, tous les réactifs doivent être remis rapidement à +2 à 8°C.

5-1- Réactifs prêts à l'emploi :

- **Réactif 1 (R1)**: microplaque : chaque support cadre contenant 12 barrettes est conditionné en sachet 'ZIP'. Une fois le cadre sorti, les barrettes non utilisées sont replacées immédiatement dans le sachet qui est renfermé soigneusement et remis à +2 à 8°C. Les barrettes ainsi conservées sont stables pendant 1 mois.
- **Réactif 3 (R3)** : contrôle négatif,

- **Réactif 4a (R4a)** : contrôle positif I,
- **Réactif 4b (R4b)** : contrôle positif II,
- **Réactif 5(R5)** : calibreur,
- **Réactif 6 (R6)** : conjugué,
- **Réactif 7 (R7)** : diluant I,
- **Réactif 9 (R9)** : Solution de Chromogène / Substrat. La fiole contenant ce réactif, photosensible, doit rester fermée s'il n'est pas utilisé ; dans le cas contraire, un précipité peut se former dans le puits de réaction.
- **Réactif 10 (R10)**: solution d'arrêt.

5-2- Réactifs à reconstituer :

- **Réactif 2 (R2)** : la solution de lavage est concentrée 20 fois (20X). Avant utilisation, 50 ml du R2 est dilué dans 1 litre d'eau distillée. On obtient ainsi la solution de lavage prête à l'emploi. Après dilution, cette solution se conserve 5 jours à +2 à 8°C.

6- Dépôt des échantillons à analyser :

Prélever un échantillon de sang selon les pratiques en usage. Les tests sont effectués sur des échantillons non dilués de sérum. Extraire le sérum du caillot ou des hématies dès que possible pour éviter toute hémolyse. Une hémolyse très prononcée peut affecter les performances du test.

Les échantillons présentant des agrégats doivent être clarifiés par centrifugation avant le test. Les particules ou agrégats de fibrine en suspension peuvent donner des résultats faussement positifs.

Les échantillons seront conservés à +2 à 8°C si le test est effectué dans les 5 jours, ou seront congelés à -20°C pendant plusieurs mois. Éviter les congélations / décongélations répétées.

Ne pas utiliser de sérums contaminés, hyper-lipémiques, ictériques, hémolysés ou inactivés à la chaleur.

7- Mode opératoire :

- Suivre strictement le protocole proposé.
- Utiliser les sérums de contrôle négatif, seuil et positifs à chaque mise en œuvre du test pour valider la qualité du test.
- Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons, lors de ce test on a pris 9 échantillons.

- Préparer la solution de lavage diluée (R2).
- Sortir le cadre support et les barrettes (R1) de l'emballage protecteur.
- Placer le nombre désiré de puits recouverts d'antigènes sur un support de microplaques.
- Prévoir 3 puits pour le calibreur, 1 puits pour le contrôle négatif, 1 puits pour les contrôles positifs I et II et 1 puits pour le blanc réactif (**figure 16**).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	E2										
B	R3	E3										
C	R4a	E4										
D	R4b	E5										
E	R5	E6										
F	R5	E7										
G	R5	E8										
H	E1	E9										

Figure 16 : Organisation de la plaque du test EBV-EA IgG ELISA et disposition des réactifs utilisés.

- Contrôles, calibreur et échantillons doivent être vortexés préalablement ; diluer les échantillons, le calibreur, les contrôles négatifs et positifs au 1/20 (par exemple 10 µl + 200 µl) avec le diluant I d'échantillon (R7) dans les tubes de dilution ou la plaque de dilution.
- Pipeter 100 µl de calibreur, de contrôles ou d'échantillon de patient dilués dans les puits indiqués. Ajouter 100 µl de diluant I d'échantillon (R7) au puits de blanc de la réaction.
- Incuber la plaque pendant 20 ± 2 minutes à température ambiante (21 à 25°C).
- Aspirer le contenu de toutes les cupules dans un conteneur pour déchets contaminés (contenant de l'hypochlorite de sodium) et ajouter immédiatement dans chacune d'elles un minimum de 300 µl de solution de lavage. Aspirer de nouveau. Répéter le lavage au moins 4 fois (un minimum de 5 lavages au total). Sécher la plaque par retournement sur une feuille de papier absorbant. Si l'on dispose d'un laveur automatique, respecter le même cycle opératoire.
- Distribuer 100 µl de conjugué (R6) prêt à l'emploi dans toutes les cupules.

- Incuber 20 ± 2 minutes à la température ambiante (21 à 25°C).
- Vider toutes les cupules par aspiration et laver 5 fois comme précédemment.
- Distribuer rapidement dans toutes les cupules 100 μ l de solution de chromogène / substrat (R9).
- Laisser la réaction se dérouler à l'obscurité pendant 10 ± 2 minutes à température ambiante. Lors de cette incubation, ne pas utiliser de film adhésif. La solution de chromogène / substrat devient bleue s'il y a présence d'IgG.
- Ajouter 100 μ l de solution d'arrêt (R10) en adoptant la même séquence et le même rythme de distribution que pour la solution de chromogène /substrat. Mélanger en tapotant la microplaque. L'addition de la solution d'arrêt entraîne le passage du bleu au jaune (**figure 17**).



Figure 17 : Préparation de la plaque du test EBV-EA IgG ELISA.

- Attendre au minimum 5 minutes avant la lecture. Essuyer soigneusement le dessous des plaques. Lire les densités optiques de chaque puits à 450 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques (nous avons utilisé un BIO-RAD PR5100) après avoir fait le blanc de l'instrument sur le puits Blanc Réactif (BR) dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction (les barrettes doivent toujours être conservées à l'abri de la lumière avant lecture).
- S'assurer avant la transcription des résultats, de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

8- Calcul et interprétation des résultats :

8-1- Calcul de la moyenne des absorbances :

- **Moyenne des Densité Optique (MDO) du Calibreur R5** : calculer la moyenne des DO en utilisant les 3 valeurs individuelles de DO du calibreur (R5). Si l'une des valeurs est aberrante, différente de plus de 15% de la DO moyenne, refaire le calcul sans l'utiliser.
- **Facteur de Correction(FC)** : afin de prendre en compte les variations journalières (temps, température), un facteur de correction, déterminé pour chaque lot de trousse, est imprimé sur l'étiquette du flacon du calibreur (R5).
- **Valeur-Seuil du calibreur (VS)** : celle-ci est obtenue en multipliant la moyenne des DO du Calibreur par le facteur de correction.
- **Valeur de l'Immune Status Ratio(ISR)** : calculer le ratio d'immunité (ISR) pour chaque échantillon en divisant la DO obtenue par la Valeur-seuil du calibreur (**figure 18**).

Paramètres de mesure :		
SUNRISE		
Mode de mesure : absorbance		
Longueur d'onde de mesure : 405 nm		
Longueur d'onde de référence : 620 nm		
Mode de longueur d'onde double : différence		
Mode de lecture : normal		
Unité : OD		
Date : 5/9/2016, temps : 12 :47 :26 pm		
A	0.015	0.13
B	0.034	0.1
C	0.043	0.06
D	0.16	0.05
E	0.380	0.018
F	0.400	0.16
G	0.420	0.09
H	0.019	0.018

$$\text{MDO} = 0,4000 \text{ nm}, \text{FC} = 0,5, \text{VS} = \text{MDO} \times \text{FC} = 0,400 \times 0,5 = 0,200$$

Figure 18 : Calcul de la moyenne des absorbances du test EBV-EA IgG ELISA.

8-2- Validation de l'essai :

- Le BR (lu contre l'air) doit être $<0,150$ à 450 nm : DO (BR) $<0,150$
- Le contrôle négatif (R3) doit être $\leq 0,250$ à 450 nm (lu contre le BR) : DO (R3) $\leq 0,250$
- Chaque calibreur (R5) doit être $\geq 0,250$ à 450 nm (lu contre le BR) : DO (R5) $\geq 0,250$
- Le contrôle positif (R4b) doit être $\geq 0,500$ à 450 nm (lu contre le BR) : DO (R4b) $\geq 0,500$
- Les valeurs d'ISR des contrôles négatif, positifs I et II (R3, R4a, R4b) doivent être dans l'intervalle indiqué sur chacun des flacons. Si ces critères ne sont pas respectés, recommencer la manipulation.

8-3- Interprétation des résultats :

Pour chaque échantillon, l'ISR est calculé en divisant la densité optique de l'échantillon par la valeur seuil :

Exemple : valeur ISR de l'échantillon E2 $ISR_{E2} = DO_{E2} / VS$

$$ISR_{E2} = 0,13 / 0,200 = 0,65$$

A	0,075	0,65
B	0,170	0,50
C	0,215	0,30
D	0,800	0,25
E	1,900	0,09
F	2	0,80
G	2,1	0,45
H	0,095	0,09

- Ces résultats des neuf échantillons sont interprétés comme suit :

Tableau IV : Valeurs d'interprétation du test EBV-EA IgG ELISA (Platelia™ BIO-RAD).

ISR échantillon	Résultats	Interprétation
≤ 0.90	Négatif	IgG anti-EBV-EA-D non détectable
0.91-1.09	Douteux	Echantillon devant être testé à nouveau
≥ 1.10	Positif	Présence d'IgG anti-EBV-EA-D

II- Le test MNI FUMOUCZE® (diagnostic immunologique de la MNI) :

1- Objectif :

Le MNI FUMOUCZE® est un test d'hémagglutination rapide (2 minutes) sur lame permettant la mise en évidence des anticorps hétérophiles présents dans le sérum en cas de mononucléose infectieuse.

2- Principe :

Les sérums des sujets atteints de MNI contiennent des anticorps hétérophiles (dirigé contre les antigènes de l'EBV) agglutinant des globules rouges de mouton, de cheval, de bœuf et de lapin. L'utilisation d'hématies de cheval spécialement traitées rend inutile l'adsorption des autres anticorps hétérophiles et assure la spécificité du test.

3- Composition du coffret :

- **REAG** : 1 flacon de 2 ml de réactif.
- **CONTROL +**: 1 flacon distributeur de 0,8 ml de témoin d'agglutination.
- **CONTROL-**: 1 flacon distributeur de 0,8 ml de contrôle négatif.
- **TEST CARD** : 7 lames à usage unique (7x6 tests).
- **STICK**: 40 agitateurs à usage unique.
- **DROPPER**: 1 compte-gouttes délivrant environ 50 µL/goutte.

Les réactifs sont prêts à l'emploi. Ils doivent être stockés à +2° à +8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur le coffret. Ne pas congeler.

4- Matériel nécessaire :

- Micropipette automatique distribuant 50 µl,
- Conteneur pour déchets contaminés.

5- Recueil, préparation et conservation des échantillons :

Utiliser du sérum fraîchement prélevé. Le test doit être effectué dans les 72 heures qui suivent le prélèvement. Les échantillons sériques peuvent être conservés 72 heures à +2° à +8°C. Au-delà de ce délai, ils doivent être congelés à -20 C. Il est recommandé de préparer des

aliquotes pour éviter les congélations / décongélations successives.

Ne pas

décomplémenté le sérum. Ne pas utiliser de sérum hémolysé, trouble ou contaminé.

6- Mode opératoire :

- Laisser les réactifs et les échantillons revenir à la température ambiante avant l'utilisation.
- À l'aide d'une micropipette, déposer 5µl du sérum à analyser sur une case de la lame.
- Agiter soigneusement le **REAG** et en déposer 1 goutte.
- Mélanger à l'aide d'un agitateur à usage unique.
- Appliquer un mouvement lent de rotation, pendant 2 minutes et observer la présence ou l'absence l'hémagglutination en plaçant la lame sous une source lumineuse. Lire les résultats pendant les 2 minutes d'agitation. Si un temps plus long s'écoule, les images peuvent être plus difficiles à interpréter, à cause de l'évaporation des réactifs.

7- Interprétation des résultats :

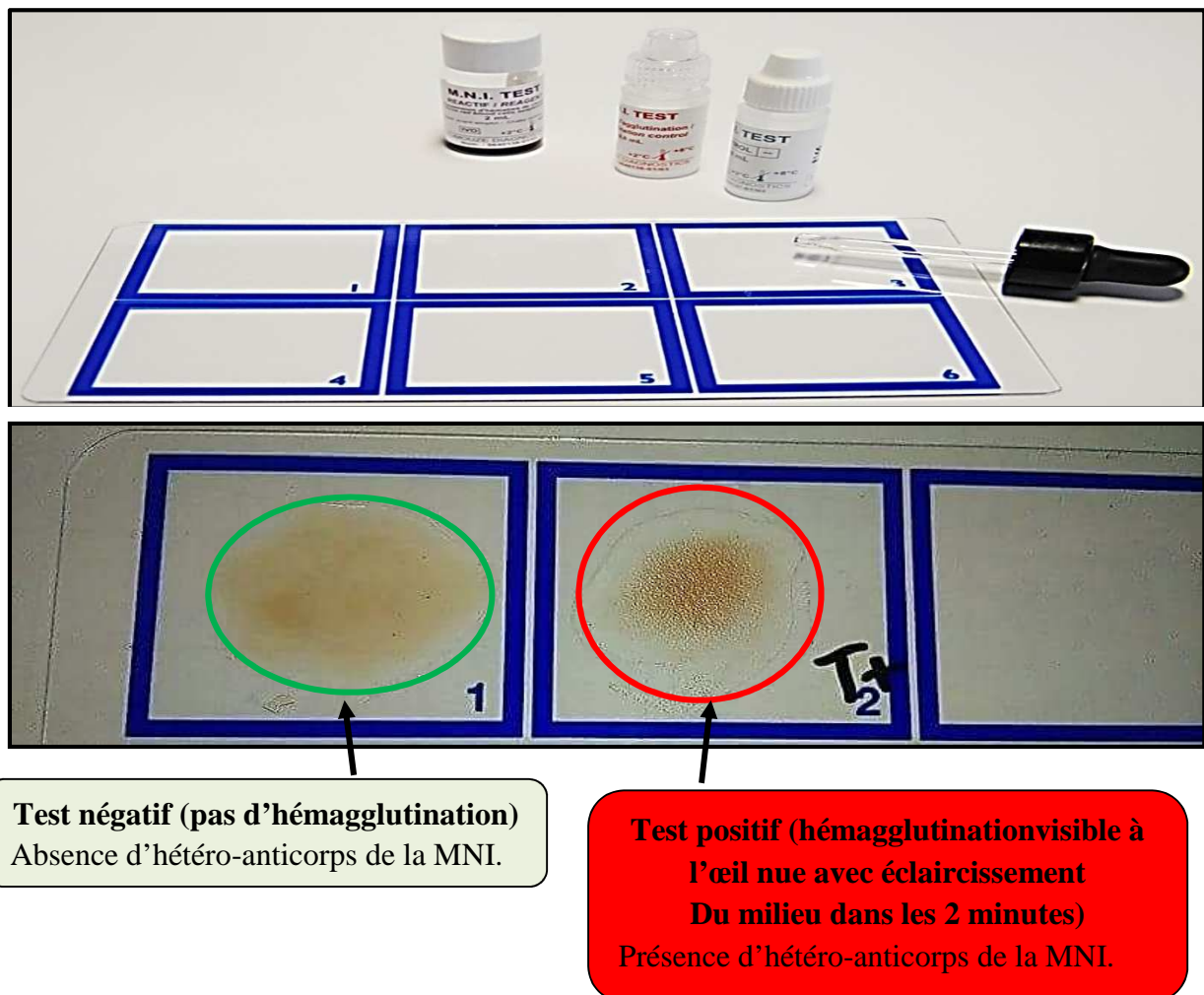


Figure 19 : Interprétation des résultats du test MNI FUMOUCZE®.

Discussion

Discussion

Le virus EBV infecte la grande majorité de la population mondiale, souvent sous la forme d'une infection asymptomatique chez l'enfant. Chez l'adolescent et l'adulte jeune, cette primo-infection s'accompagne fréquemment d'un ensemble de signes cliniques que l'on regroupe sous le terme de mononucléose infectieuse. Le virus persiste ensuite dans l'organisme pendant toute la vie, à l'état latent dans des lymphocytes B, mais aussi sous forme de particules virales infectieuses excrétées au niveau de l'oropharynx et dans la salive. Cette réactivation virale, intermittente chez le sujet immunocompétent, est accrue grandement lors des états d'immunodépression.

L'EBV possède la propriété remarquable d'induire la prolifération continue et anarchique des lymphocytes B infectés. Les principaux signes cliniques de la MNI sont provoqués par l'intense réaction immunitaire dirigée contre cette lympho-prolifération B EBV-induite. En revanche, chez l'immunodéprimé, cette prolifération peut aboutir à un lymphome malin. Par ailleurs, le virus est impliqué dans la pathogénie de plusieurs cancers aux dépens des lymphocytes ou des cellules épithéliales, comme le lymphome de Burkitt, le carcinome du naso-pharynx, ou le lymphome de Hodgkin.

Le diagnostic de la MNI repose avant tout sur la sérologie spécifique de l'EBV. Au contraire, dans le cas des maladies malignes associées à l'EBV, la détection du génome viral et/ou sa quantification sont les analyses les plus importantes. On peut donc schématiquement regrouper les objectifs du diagnostic virologique de l'infection à EBV dans quatre catégories :

- 1- Diagnostiquer, dans un contexte d'infection aiguë, une MNI et plus généralement une primo-infection à EBV.
- 2- Apporter des arguments étiologiques en cas de pathologie tumorale : cancers associés au virus chez le sujet immunocompétent (lymphome de Burkitt, carcinome du naso-pharynx, lymphome de Hodgkin ... etc).
- 3- Prédire l'émergence d'un lymphome à EBV chez l'immunodéprimé, et suivre l'évolution de la charge virale.
- 4- Dépister l'infection à EBV lors d'un don d'organes ou de cellules, dans un contexte plus général de transmission d'une souche virale d'un donneur à un receveur.

Selon ces différents contextes, l'exploration biologique de l'EBV reposera plutôt sur des tests sérologiques, ou plutôt sur des méthodes moléculaires.

Discussion

Le diagnostic sérologique repose sur la détection ou le titrage des anticorps dirigés contre plusieurs types d'antigènes EBV : des antigènes du cycle productif comme les VCA et les EA, des antigènes du cycle de latence comme les EBNA.

Les méthodes immuno-enzymatiques ont commencé à être appliquées à la sérologie EBV dès les années 1980. La qualité des antigènes, qui étaient extraits des cellules lymphoïdes et purifiés, s'est lentement améliorée. On peut stimuler les cellules lymphoïdes pour obtenir de plus grandes quantités d'antigènes, notamment des EA. Ce procédé de purification permet d'obtenir des mélanges d'antigènes, comme par exemple VCA+EA+EBNA.

Les protéines recombinantes sont de plus en plus utilisées, telles quelles ou modifiées en gardant la partie la plus immunogène ou en enlevant des éléments pouvant entraîner une moins bonne spécificité. Les peptides synthétiques sont également utilisés. Il existe aujourd'hui sur le marché une grande variété de trousse pour détection des anticorps sur microplaques.

Par analogie avec les méthodes d'immunofluorescence mises au point anciennement, les trousse ELISA en microplaques ont été développées en général pour détecter les anticorps anti-VCA, anti-EBNA et parfois anti-EA. La configuration la plus classique de ces trousse associe la détection des IgG anti-VCA, des IgM anti-VCA et des IgG anti-EBNA. C'est en effet la configuration la plus utile pour établir un profil sérologique interprétable dans les principales situations cliniques de primo-infection. Il faut remarquer que certains réactifs permettent de détecter les IgM anti-EA. En revanche, les trousse permettant de détecter les IgM anti-EBNA1 ne sont pas utilisées pour le diagnostic précoce de la MNI. La détection des IgA anti-VCA a, semble-t-il, été validée pour quelques trousse, mais ce test n'est employé que dans le carcinome du nasopharynx. Les IgA anti-EA sont rarement utilisées.

Les IgG anti-EA n'apparaissent pas dans tous les cas de MNI ; elles servent surtout à confirmer un titre d'IgG anti-VCA élevé lors des cancers associés à l'EBV. Selon l'intensité du signal coloré, le titre des anticorps est plus ou moins élevé : on dispose ainsi d'un résultat semi-quantitatif ou même quantitatif, qui sera parfois utilisé en situation de maladie chronique associée à l'EBV.

Quelques rares trousse d'ELISA en plaques contiennent non pas des antigènes séparés, mais des mélanges d'antigènes ; on parlera ainsi d'antigène EBV (et non plus d'antigène VCA ou EA, ou d'antigène EBNA). D'autres trousse plus nombreuses utilisent des antigènes recombinants ou des peptides synthétiques. Les résultats peuvent être très bons, mais il faut valider ces trousse en situation clinique. En effet, les spécificités, sensibilité et cinétique des anticorps au début de la MNI doivent être connues de l'utilisateur.

Discussion

Les tests d'ELISA sur membranes, sous forme de bandelettes, sont très utilisés car, unitaires, ils permettent d'analyser rapidement un sérum. On détecte séparément les IgG et les IgM. Les spots colorés sont parfois discrets, et la lecture peut se révéler délicate.

À travers ces données rapportées dans la littérature, il paraît évident que le test utilisé (EBV-EA IgG ELISA Platelia™ BIO-RAD) en Algérie, au niveau des structures de santé publique, pour la détection et la quantification de la charge virale paraît très limité et donne des informations parcellaires et incomplètes qui ne permettent pas de cerner toutes les implications d'une infection virale par l'EBV. Des tests complémentaires doivent être pratiqués.

Un autre test utilisé dans les laboratoires algériens pour le diagnostic biologique de l'EBV est le test MNI FUMOUCHE® basé sur la détection d'anticorps hétérophiles. Il s'agit d'anticorps non spécifiques de l'EBV qui apparaissent souvent au cours de la MNI typique. C'est donc un bon test diagnostique pour cette maladie mais qui n'est d'aucune utilité dans les cancers associés à l'EBV. Une première méthode pour les détecter avait été mise au point par *Paul* et *Bunnell* et optimisée ensuite par *Davidsohn*. Ces anticorps hétérophiles spécifiques de la MNI, appelés également anticorps *Paul-Bunnell-Davidsohn* (PBD), sont des IgM qui agglutinent différentes sortes de globules rouges animaux.

Malgré sa simplicité, la réaction de PBD utilise un certain nombre de tubes (ou puits) et reste donc laborieuse. Pour cette raison, de nombreux tests d'agglutination sur lames à lecture rapide ont vu le jour. Tout en conservant globalement le principe du PBD, ces tests sur lames qualitatifs ("MNI test") et utilisables en diluant le sérum combinent souvent absorption sur extrait de rein de cobaye et sur stroma de globules rouges de bœuf, et agglutination de globules rouges de cheval. On voit des agglutinats d'hématies à l'œil nu au bout de quelques minutes. D'autres tests rapides plus récents utilisent des particules de latex recouvertes d'antigènes érythrocytaires de bœuf purifiés.

Enfin on trouve aussi des tests de type immuno-dot ou immuno-chromatographie. Cette recherche des anticorps hétérophiles PBD fait également partie des tests unitaires sur bandelettes révélés par une anti-IgM, à côté des VCA.

Discussion

La détection de l'EBV et l'estimation de sa quantité se basaient initialement sur des techniques de culture cellulaire. Plus tard, le génome EBV a été recherché par des méthodes d'hybridation moléculaire telles que le dot-blot ou le Southern blot, prenant en compte la complémentarité des bases nucléotidiques des acides nucléiques. La détection de ces acides nucléiques viraux se fait grâce à une sonde nucléotidique marquée qui se fixe spécifiquement sur la partie de l'acide nucléique dont elle est complémentaire. Les acides nucléiques sont extraits de l'échantillon à analyser puis immobilisés sur une membrane de nitrocellulose. La fixation de la sonde sur le support est révélée radioactivement ou chimiquement, selon que la sonde est marquée par un isotope radioactif ou par une substance chimique. Ces techniques fastidieuses ont cédé la place à d'autres techniques comme l'hybridation *in situ* et la PCR.

La technique d'hybridation *in situ* offre l'avantage de pouvoir identifier le type et le pourcentage des cellules infectées. En effet, elle permet de détecter des acides nucléiques viraux dans des cellules reconnaissables. En matière d'EBV, ce sont essentiellement les ARNs EBER produits en très grande quantité qui sont détectés par cette technique, par ailleurs pas extrêmement sensible.

La PCR repose sur l'amplification puis la détection de séquences du génome EBV. Essentiellement qualitative avec une réponse positive ou négative, elle a été remplacée ces dernières années par des techniques de quantification moléculaire pour évaluer la charge virale dans un tissu ou dans un liquide biologique. Cette quantification est effectuée après amplification de séquences nucléotidiques conservées et si possible uniques dans le génome. Elle permet de suivre la dynamique du virus dans le sang périphérique, de détecter une éventuelle réactivation avant l'apparition de signes cliniques, et d'instaurer une thérapeutique adaptée.

Les premières PCR quantitatives développées étaient en réalité des méthodes semi-quantitatives, où la quantification de la cible était effectuée par comparaison avec une gamme d'un étalon externe, sur gel d'agarose ou par Southern blot. Ces techniques, bien que parfois très sensibles étaient fastidieuses et pouvaient poser des problèmes de reproductibilité. Elles sont actuellement abandonnées au profit de techniques quantitatives plus fiables en termes de précision et de reproductibilité. On distingue les PCR quantitatives compétitives et les PCR en temps réel. Ces dernières possèdent généralement un plus large spectre dynamique de mesure, et l'absence de manipulations post-PCR les rend à la fois plus rapides et plus maniables.

Les PCR quantitatives compétitives sont basées sur la co-amplification de la cible et d'un standard interne. Le standard interne est souvent un produit ayant le même nombre de bases que la cible, avec des extrémités (zone de fixation des amorces) identiques à celles de la cible. Seule la région interne diffère entre les deux fragments, ce qui permettra, lors de la révélation, de distinguer la cible du standard interne.

Discussion

La quantification est mesurée par des techniques immuno-enzymatiques, par densitométrie sur gel d'agarose ou par Southern blot. Le risque de contamination lors de l'ouverture des tubes PCR au moment de la révélation et la longueur de la technique (6 heures) représentent les principales limites des PCR quantitatives compétitives.

En plus de la quantification de l'ADN EBV, l'analyse quantitative des ARNm codant les protéines de latence ou celles du cycle lytique a été proposée comme un moyen de préciser le type du cycle de multiplication de l'EBV (lytique ou latent) dans un prélèvement donné. En effet, il a été mis au point des techniques de quantification par PCR en temps réel d'un ARNm de la latence (LMP1) et de 2 ARNm tardifs du cycle lytique (gp350 et protéase). La lourdeur de la technique et la mauvaise stabilité des ARNm limitent pour l'instant cette analyse.

Actuellement, dans notre pays, l'ELISA et le MNI test sont les principales techniques sur lesquelles se base le diagnostic biologique de l'EBV et permettent un diagnostic dit « indirect » qui reste, par conséquent, très limité.

Un résultat négatif obtenu dans le test ELISA (Anti-EBV EBNA IgG) n'exclut pas totalement une infection par l'EBV. Ces résultats doivent être utilisés conjointement avec les informations disponibles sur l'évaluation clinique du patient et les autres procédures de diagnostic existantes. Les résultats des tests de patients immunodéprimés peuvent être difficiles à interpréter. Des résultats positifs peuvent ne pas être validés chez des personnes ayant reçu des transfusions sanguines ou d'autres produits sanguins au cours des derniers mois. Ce test peut être limité par la disponibilité des anticorps spécifique. En effet, l'existence d'un syndrome mono-nucléosique associé à un MNI positif permet dans la plupart des cas un diagnostic rapide et précoce de la mononucléose infectieuse. Cependant, des formes de mononucléose séronégative, en particulier chez les jeunes enfants et dans certains cas à expression clinique plus modérée peuvent existés. En cas de négativité du MNI, il est indispensable d'associer à ce dernier une recherche des anticorps anti-EBV.

Le recours à des techniques de biologie moléculaire tel que la PCR quantitative permettent, aujourd'hui, de mettre en évidence la présence de l'EBV mais surtout la quantification de la charge virale présente dans le sang circulant, les leucocytes, le plasma ou le sérum, éventuellement le liquide céphalo-rachidien ou les tissus. Cet apport considérable permet un meilleure prise en charge de l'infection à EBV et la possibilité de mieux cerner l'aspect physiopathologique du virus dans le développement de pathologies qui lui sont associées.

Conclusion
et
Perspectives

Depuis quelques années, de nombreuses informations sur l'histoire naturelle et la physiopathologie de l'infection à EBV ont émergé. Il faut bien reconnaître que cette masse de nouvelles données n'a pas eu une grande conséquence sur la prise en charge en pratique (traitements et vaccins) de ces infections. Néanmoins, des questions passionnantes restent à explorer : l'infection des cellules épithéliales par ce virus lymphotrope, la fréquence des MNI graves et leur mécanisme, la recherche de stratégies antivirales ou immuno-modulatrices efficaces, les relations entre MNI et cancers associées à l'EBV ou d'autres maladies chroniques.

L'EBV a été décrit comme étant impliqué dans la survenue de nombreuses pathologies cancéreuses d'origine lymphoïde ou épithéliale. Son impact étiologique dans la apparition de ces maladies en Algérie n'est pas encore parfaitement défini (agent causal ou plutôt un facteur favorisant en interaction avec des facteurs génétiques et/ou environnementaux).

Le diagnostic biologique de l'EBV en Algérie est basé sur des tests sérologiques qui ont rapidement montrés leurs limites. Il paraît évident qu'il est nécessaire d'intégrer des techniques moléculaire à l'ensemble des données cliniques et biologiques recueillies. Cela va permettre un diagnostic précoce et donner une meilleure estimation de la charge virale contribuant ainsi en grande partie à améliorer la prise en charge de cette infection dans notre pays.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- 1- **AL TABAA Y, TUAILLON E, BOLLORE A et al.** 2009. Functional Epstein-Barr virus reservoir in plasma cells derived from infected peripheral blood memory B cells. *Blood*. 113, 604-11.
- 2- **ALFIERI C, BIRKENBACH M et KIEFF E.** 1991. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology*. 181, 595-608.
- 3- **ALOTAIBI S, KENNEDY R, TELLIER I et al.** 2004. Epstein-Barr virus in pediatric multiple sclerosis. *JAMA*. 291:1875-9.
- 4- **ARMITAGE O, BIERMAN P, BOCIEK K et al.** 2006. Burkitt Lymphoma, classification and treatment. Williston Park, NY: CMP Healthcare Media. 20(3): pp. 231-239.
- 5- **BAER R, BANKIER A, BIGGIN S et al.** 1984. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature*. 310, 207-211.
- 6- **BARTEL D.** 2004. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 116, 281-297.
- 7- **BARTH S, PFUHL T, MAMIANI D et al.** 2007. Epstein-Barr virus-encoded microRNA miR-BART2 down-regulates the viral DNA polymerase BALF5. *Nucleic Acids Research*. 36, 666-675.
- 8- **BLUM K, LOZANSKI G et BYRD C.** 2004. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood*. 104, 3009-3020.
- 9- **BRADY G, MACARTHUR G et FARRELL P.** 2007. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol*. 60:1397-1402.
- 10- **CAI X, SCHÄFER A, LU S et al.** 2006. Epstein-Barr Virus MicroRNAs Are Evolutionarily Conserved and Differentially Expressed. *PLoS Pathog*. 2, e23.
- 11- **CALLAN MFC.** 2004. The immune response to Epstein-Barr virus. *Microbes and infection /Institut Pasteur*. 6(10):937-945.
- 12- **CARPENTER LM, NEWTON R, CASABONNE et al.** 2008. Antibodies against malaria and Epstein-Barrvirus in childhood Burkitt lymphoma: a case-control study in Uganda. *Int J Cancer*. 122:1319---23.
- 13- **CHAPLIN D.** 2006. Overview of the human immune response. *J A.llergy Clin Immunol*. 117:S430 435.
- 14- **CHESNOKOVA L, NISHIMURA S et HUTT-FLETCHER L.** 2009. Fusion of epithelial cells by Epstein-Barr virus proteins is triggered by binding of viral glycoproteins gHgL to integrins alphavbeta6 or alphavbeta8. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 20464 20469.

- 15- CLAVE E, AGBALIKA V, BAJZIK N et al.** 2004. Epstein-barr virus réactivation in allogéneic stem-cell transplantation : relationship between viral load, EBV-specific T-cell reconstitution and rituximab therapy. *Transplantation*. 77:76-84.
- 16- CULLEN B.** 2006. Viruses and microRNAs. *Nature Genetics*. 38, S25-S30.
- 17- DANG C.** 2012. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. 149:22-35.
- 18- DAVE SS, FU K, WRIGHT GW et al.** 2006. Molecular diagnosis of Burkitt's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 354, 2431-2442.
- 19- DEHEE A, ASSELOT C, PIOLOT T et al.** 2001. Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR. *J. Med. Virol.* 65(3), 543-52.
- 20- ELLIOTT J, GOODHEW E, KRUG L et al.** 2004. Variable Methylation of the Epstein-Barr Virus Wp EBNA Gene Promoter in B Lymphoblastoid Cell Lines. *Journal of Virology* . 78, 14062-1406
- 21- EPSTEIN M, ACHONG B et BARR Y.** 1964. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 15, 702-703.
- 22- FARRELL P.** 2000. Cell-switching and kissing. *Nat Med*. 8, 559-560.
- 23- FAULKNER G, BURROWS S, KHANNAN et al.** 1999. X-Linked agammaglobulinemia patients are not infected with Epstein-Barr virus: implications for the biology of the virus. *J Virol.* 73, 1555-64.
- 24- FEEDERLE R, HAAR J, BERNHARDT M et al.** 2011. The Members of an Epstein-Barr Virus MicroRNA Cluster Cooperate To Transform B Lymphocytes. *Journal of Virology*. 85, 9801-9810.
- 25- GRUFFAT H, KADJOUF F, MARIAMÉ S et al.** 2012. The Epstein-Barr Virus BcRF1 Gene Product Is a TBP-Like Protein with an Essential Role in Late Gene Expression. *J Virol.* 86(11):6023-32.
- 26- GRUNEWALD V, BONNET M, BOUTIN C et al.** 1998. Amino-acid change in the Epstein-Barr-Virus ZEBRA protein in undifferentiated nasopharyngeal carcinomas from Europe and North Africa. *Int J Cancer*. 75 :497-503.
- 27- HADINOTO V, SHAPIRO M, SUN S et al.** 2009. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog.* 5, e1000496.
- 28- HARDIE DR.** 2010. Human gamma-herpesviruses: a review of 2 divergent paths to oncogenesis. *Transfus Apher Sci.* 42(2):177-183.
- 29- HEBNER C et LASANEN J.** 2003. The spacing between adjacent binding sites in the family of repeats affects the functions of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in transcription activation and stable plasmid maintenance. *Virology*. 311(2): 263-74.

- 30- HENLE G, HENLE W et DIEHL V.** 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpesypte virus to infectious mononucleosis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 59, 94.
- 31- HENLE, G, HENLE, W, CLIFFORD et al.** 1970. Antibodies to Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma and control groups. J. Natl. Cancer Inst. 43, 1147-1157.
- 32- HESS RD.** 2004. Routine Epstein-Barr virus diagnosis from the laboratory perspective :still challenging after 35 years. J. Clin. Microbiol. 42, 3381-3387.
- 33- HOCHBERG D, MIDDELDORP M, CATALINA S et al.** 2004. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virusphenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 101,239-244.
- 34- HUMMEL M, BENTINK S, BERGER D et al.** 2006. A biologic definition of Burkitt's lymphoma from transcriptional and genomic profiling. N Engl J Med . 354 : 2419-30 .
- 35- HURET L, SENON S, BERNHEIM F et al.** 2004. An Atlas on genes andchromosomes in oncology and haematology. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). 50, 805-807.
- 36- HUTCHINGS A, TIERNEY R, KELLY L et al.** 2006. Methylation Status of the Epstein-Barr Virus (EBV) BamHI W Latent Cycle Promoter and Promoter Activity: Analysis with Novel EBV-Positive Burkitt and Lymphoblastoid Cell Lines. Journal of Virology . 80, 10700-10711.
- 37- HUTT-FLETCHER LM.** 2007. Epstein-Barr virus entry. J Virol . 81(15):7825-7832.
- 38- JOHANNSEN E, LUFTIG M, CHASE T et al.** 2004. Proteins of Purified Epstein-Barr Virus. PNAS. 101,16286-16291.
- 39- JUILLARD F, BAZOT Q, MURE B et al.** 2012. Epstein–Barr Virus Protein EB2 Stimulates Cytoplasmic mRNA Accumulation by Counteracting the Deleterious Effects of SRp20 on Viral mRNAs. Nucleic Acids Res. 40(14):6834-49.
- 40- KAMRANVAR S, GRUHNE B, SZELES S et al.** 2007. Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. Oncogene. 26, 5115-5123.
- 41- KAPATAI G et MURRAY P.** 2007. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. J Clin Pathol. 60(12):1342-9.
- 42- KELLY G.** 2009. An Epstein-Barr virus anti-apoptotic protein constitutively expressed intransformed cells and implicated in burkitt lymphomagenesis: the Wp/BHRF1 link. PLoS Pathog. 5, e1000341.
- 43- KELLY G et RICKINSON A.** 2007. Burkitt lymphoma: revisiting the pathogenesis of a virus-associated malignancy. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 277-284.
- 44- KELLY G, LONG H STYLIANOU E et al.** 2009. An Epstein-Barr Virus Anti- Apoptotic Protein Constitutively Expressed in Transformed Cells and Implicated in Burkitt Lymphomagenesis: The Wp/BHRF1 Link. PLoS Pathog .5, e1000341.

- 45- KENNEDY G et SUGDEN B.** 2003. EBNA-1, a Bifunctional Transcriptional Activator. *Mol Cell Biol* . 23, 6901-6908.
- 46- KITAMURA R et SEKIMOTO T.**2006. Nuclear import of Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 mediated by NPI-1 (Importin alpha5) is up- and down-regulated by phosphorylation of the nuclear localization signal for which Lys379 and Arg380 are essential. *J Virol* .80(4): 1979-91.
- 47- KLAPPROTH K et WIRTH T.** 2010. Advances in the understanding of MYC-induced lymphomagenesis. *Br. J. Haematol.* 149, 484-497.
- 48- KUTOK JL et WANG F.** 2006. Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol.* 1:375-404.
- 49- LANDAIS E, SAULQUIN X et HOUSSAINT E.** 2005. The human T cell immune response to Epstein-Barr virus. *Int J Dev Biol.* 49:285-292.
- 50- LAUX G, DUGRILLON F, ECKERT O et al.** 1994. Identification and characterization of an Epstein-Barr virus nuclear antigen 2- responsive cis element in the bidirectional promoter region of latent membrane protein and terminal protein 2 genes. *J Virol.* 68, 6947-6958.
- 51- LING D, PENG S, NAKAJIMA R et al.**2005. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J.* 24, 3565-3575.
- 52- Lo, F., To, F., Lo et al.** 2007. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104, 16164-16169.
- 53- LOSSIUS A, JOHANSEN O, TORKILDSEN V et al.** 2012. Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and multiple sclerosis-association and causation. *Viruses.* 4:3701-3730.
- 54- MANET E, SERGEANT A et GRUFFAT H.** 2003. Cycle productif du virus d'Epstein-Barr: rôle de la protéine virale EB1 dans l'activation du cycle productif et interactions protéine EB1- cellules hôte. *Virologie.* 7, 111-123.
- 55- MERCHANT M et SWART R.** 2001. The effects of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A on B cell function. *Int Rev Immunol.* 20(6): 805-35.
- 56- MOLESWORTH S, LAKE M, BORZA S et al.** 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.
- 57- MOSSMAN L et ASHKAR A.** 2005. Herpesviruses and the innate immune response. *Viral Immunol.* 18:267-281.
- 58- NANBO A, YOSHIYAMA H et TAKADA K.** 2005. Epstein-Barr Virus-Encoded Poly(A)-RNA Confers Resistance to Apoptosis Mediated through Fas by Blocking the PKR Pathway in Human Epithelial Intestine 407 Cells. *J Virol.* 79, 12280-12285.

- 59-NELSON M, PERKINS S et DAVE B.** 2010. An increased frequency of 13q deletions detected by fluorescence in-situ hybridization and its impact on survival in children and adolescents with burkitt lymphoma: results from the Children's Oncology Group study CCG-5961. *Br J haematol.* 148:600-10.
- 60-ODA T, IMAI S, CHIBA S et al.** 2000. Epstein–Barr Virus Lacking Glycoprotein gp85 Cannot Infect B Cells and Epithelial Cells. *Virology.* 276, 52-58.
- 61-ORAZI A et HROMAS A.** 1977. Posttransplantation Lymphoproliferative disorders in bone marrow transplant recipients are aggressive with the high incidence of adverse histologic and immunobiologic features. *Am J Clin Pathol.*107(4) :419-29.
- 62-OWEN T, O'NEIL D, DAWSON L et al.**2010. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Molecular Cancer.* 9, 241.
- 63-PAKPOOR J, DISANTO G, GERBER F et al.** 2013. The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis. *Mult Scler.* 19:162-6.
- 64-PANG F et LIN K.** 2009. The signaling pathways of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A (LMP2A) in latency and cancer. *Cell Mol Biol Lett.* 14(2): 222 47.
- 65-PASCHOS K.** 2009. Epstein-barr virus latency in B cells leads to epigenetic repression and CpGmethylation of the tumour suppressor gene Bim. *PLoS Pathog.* 5, e1000492
- 66-PAYA V et FUNG J.** 1999.Epstein-Barr virus-induced posttransplant Lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD Task Force and The Mayo Clinic Organized International Consensus Development Meeting. *Transplantation.* 68(10) :1517 25.
- 67-PEGTEL M, MIDDELDORP J et THORLEY-LAWSON A.** 2004.Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol.* 78, 12613-12624.
- 68-PENG RS et MOSES C.** 2005. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol.* 79(7): 4492-505.
- 69-PFEFFER S, ZAVOLAN M, GRÄSSER T et al.** 2004. Identification of Virus-Encoded MicroRNAs. *Science.* 304, 734-736.
- 70-RICCI P, MURE F, GRUFFAT O et al.** 2009. Translation of intronless RNAs is strongly stimulated by the Epstein–Barr virus mRNA export factor EB2. *Nucleic Acids Res.* 37, 4932-4943.
- 71-RICKINSON A et KIEFF E.** 2007. Epstein-Barr Virus. *Fields Virology,* 5th edition. Chapter 68B:2655-700.
- 72-ROGERS P, WOISETSCHLAEGER M et SPECK H.** 1990. Alternative splicing dictates translational start in Epstein-Barr virus transcripts. *EMBO J.* 9, 2273-2277.

- 73- ROUGHAN E et THORLEY-LAWSON A.** 2009. The intersection of Epstein-Barr virus with the germinal center. *J Virol.* 83, 3968-76.
- 74- ROUGHAN E, TORGBOR C et THORLEY-LAWSON A.** 2010. Germinal center B cells latently infected with Epstein-Barr virus proliferate extensively but do not increase in number. *J Virol.* 84, 1158-68.
- 75- ROWE M, KELLY G, BELL L et al.** 2009. Burkitt's lymphoma: the Rosetta Stone deciphering Epstein-Barr virus biology. *Semin Cancer Biol.* 19, 377-88.
- 76- SEIGNEURIN JM, LARRAT S, MORAND P et al.** 2009. Inhibition of Epstein-Barr virus replication by small interfering RNA targeting the Epstein-Barr virus protease gene. *Antivir Ther.* 14(5) : 655-62.
- 77- SERIO R, CAHILL N, PROUT D et al.** 1998. A Functionally Distinct TATA Box Required for Late Progression through the Epstein-Barr Virus Life Cycle. *Journal of Virology.* 72, 8338.
- 78- SETO E, MOOSMANN A, GRÖMMINGER F et al.** 2010. Micro RNAs of Epstein-Barr Virus Promote Cell Cycle Progression and Prevent Apoptosis of Primary Human B Cells. *PLoS Pathogens.* 6, e1001063.
- 79- SHAH NN.** 2014. Burkitt and lymphoblastic lymphoma: clinical therapy and outcome. In: Marcus R, et al. (eds). *Lymphoma: Pathology, Diagnosis and Treatment.* 2nd edition. Cambridge University Press, Cambridge UK. 172-190.
- 80- SHANNON-LOWE D, NEUHIERL B, BALDWIN B et al.** 2006. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103, 7065-7070.
- 81- SHIRE K et KAPOOR P.** 2006. Regulation of the EBNA1 Epstein-Barr virus protein by serine phosphorylation and arginine methylation. *J Virol.* 80(11): 5261-72.
- 82- SINCLAIR A, BRIMMELL M, SHANAHAN V et al.** 1991. Pathways of activation of the Epstein-Barr virus productive cycle. *J Virol.* 65, 2237-2244.
- 83- SMITH P, DE JESUS O, TURNER D et al.** 2000. Structure and Coding Content of CST (BART) Family RNAs of Epstein-Barr Virus. *J Virol.* 74, 3082-3092.
- 84- SVAHN A, MAGNUSSON M, JAGDAHL L et al.** 1997. Evaluation of three commercial Enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection, *J. Clin. Microbiol.* 35, 2728-2732.
- 85- THORLEY-LAWSON D et GROSS A.** 2004. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med.* 350, 1328-37.
- 86- TIERNEY R, KIRBY H et NAGRA J.** 2000. Methylation of Transcription Factor Binding Sites in the Epstein-Barr Virus Latent Cycle Promoter Wp Coincides with Promoter Down-Regulation during Virus-Induced B-Cell Transformation. *Journal of Virology.* 74, 10468.

- 87- TOMKINSON B, ROBERTSON E et KIEFF E.** 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol.* 67, 2014-2025.
- 88- VAN BEEK J, BRINK A, VERVOORT M et al.** 2003. In vivo transcription of the Epstein-Barr virus (EBV) BamHI-A region without associated in vivo BARF0 protein expression in multiple EBV-associated disorders. *J Gen Virol.* 84(Pt 10):2647-59.
- 89- VITA M et HENRIKSSON M.** 2006. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for humancancer. *Semin Cancer Biol.* 16, 318-330.
- 90- WADE M et ALLDAY M.** 2000. Epstein-Barr virus suppresses a G(2)/M checkpoint activated by genotoxins. *Mol Cell Biol.* 20(4): 1344-60.
- 91- WESTPHAL E, MAUSER A, SWENSON J et al.** 1999. Induction of Lytic Epstein-Barr Virus (EBV) Infection in EBV-Associated Malignancies Using Adenovirus Vectors in Vitro and in Vivo. *Cancer Res.* 59, 1485-1491.
- 92- WILLIAMS H et CRAWFORD D.** 2006. Epstein-Barr virus: the impact of scientific advances on clinical practice. *Blood.* 107:862-869.
- 93- YANG L, AOZASA K, OSHIMI K et al.** 2004. Epstein-Barr Virus (EBV)-Encoded RNA Promotes Growth of EBV-Infected T Cells Through Interleukin-9 Induction. *Cancer Res.* 64, 5332-5337.
- 94- YOUNG L et RICKINSON A.** 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer.* 4(10): 757-68.
- 95- YUE W, SHACKELFORD J et PAGANO J.** 2006. cdc2/Cyclin B1-Dependent Phosphorylation of EBNA2 at Ser243 Regulates Its Function in Mitosis. *J Virol.* 80,2045-2050.
- 96- ZALANI S, HOLLEY-GUTHRIE E et KENNEY S.** 1996. Epstein-Barr viral latency is disrupted by the immediate-early BRLF1 protein through a cell-specific mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 9194-9199.

Annexes

Annexe I : Nomenclature des protéines de l'EBV (Andersson *et al.*, 2000).

BALF1 inhibiteur de l'apoptose
BALF2 protéine majeure de fixation de l'ADN simple brin
BALF3 terminase
BALF4 gp115 GP110 precursor glycoprotéine B
BALF5 ADN polymérase ADN-dépendante
BaRF1 petite sous-unité de la ribonucléotide réductase
BARF1 p33 early prot colony-stimulating factor 1
BBLF1 inconnues
BBLF2 inconnues
BBLF3 inconnues
BBLF4 protéine associée à l'helicase/primase
BBRF1 protéine mineure de la capsid
BBRF2 inconnues
BBRF3 glycoprotéine M
BCLF1 MCP protéine majeure de la capsid
BCRF1 inconnues
BCRF1 (precursor) interleukine virale -10
BDLF1 VP23 protéine mineure de la capsid
BDLF2 inconnues
BDLF3 mb antigen gp85 glycoprotéine
BDLF4 inconnues
BDRF1 scaffold prot terminase
BERF2A/B EBNA-3B/4 nuclear prot antigène nucléaire de latence
BERF3/4 EBNA-3C/4B EBNA-6 antigène nucléaire de latence
BFLF1 major envelope gp protéine de clivage / compactage de l'ADN
BFLF2 phosphoprotéine nucléaire?
BFRF1 protéine de tégument
BFRF2 capsid ?
BFRF3 VP26, capsid prot, VCA p18 protéine de capsid
BGLF1 inconnues
BGLF2 protéine de tégument
BGLF3 inconnues
BGLF4 protéine kinase Ser/Thr
BGLF5 exonucléase alcaline
BGRF1 BDRF1 protéine de compactage de l'ADN
BHRF1 EA-R nuclear antigen composant du complexe antigène précoce
BILF1 mb prot inconnues
BILF2 mb gp 55-78 glycoprotéine
BKRF1 EBNA-1 EBNA-1 (basse complexité)

BKRF2 (precursor) glycoprotéine L
BKRF3 uracil-ADN glycosylase
BKRF4 inconnues
BLLF1 MA gp340/220 glycoprotéine majeure de membrane
BLLF2 inconnues
BLLF3 dUTPase
BLRF1 Protéine de membrane, glycoprotéine N
BLRF2 inconnues
BLRF3 antigène nucléaire de latence
BMLF1 diffuse early antigen EB2 régulateur post-transcriptionnel
BMRF1 EA-D
BMRF2 inconnues
BNLF1 LMP-1 P63 Protéine membranaire de latence LMP1
BNRF1 mb antigen p140 protéine de tégument
BOLF1 capsid assembly prot protéine de tégument
BORF1 capsid assembly prot Protéine de maturation et d'assemblage de l'ADN
BORF2 réductase ribonucléotidique
BPLF1 protéine de tégument
BRLF1 activateur de transcription Rta
BRLF1 domaine bZIP
BRRF1 inconnues
BRRF2 inconnues
BSLF1 helicase/primase
BSRF1 inconnues
BTRF1 inconnues
BVRF1 EC-RF2 protéine de tégument du virion
BVRF2 P40 EC-RF3(a) protéinase/protéine d'échafaudage de la capside
BWRF1 (12 copies) / BCRF2 inconnues
BXLF1 thymidine kinase
BXLF2 gp85 precursor glycoprotéine H
BXRF1 EC-RF1 protéine de fusion
BYRF1 EBNA2 EBNA2
BZLF1 Zebra EB1 protéine transactivatrice
BZLF2 glycoprotéine
EBNA1 antigène nucléaire
EBNA3A (BLRF3+BERF1)
LF2 inconnues
LF3 inconnues
LMP2A/B protéine membranaire de latence 2A/B

Involvement of Epstein-Barr virus in the development of lymphomas (The example of Burkitt's lymphoma)

Abstract:

The Epstein Barr Virus (EBV) is a double-stranded DNA virus, ubiquitous, that infects more than 95% of the world population and with high oncogene potential. Often asymptomatic in children, infection among adolescents and young adults is involved in the pathogenesis of several cancers that develop at the expense of B cells or epithelial cells. Causative agent of infectious mononucleosis, it is frequently associated with cancerous pathologies such as Burkitt's lymphoma. The role of EBV in the initiation and the extension of these tumors remain unclear. However, its existence to the clonal status in most cancer cells suggests that its presence is far from coincidental.

It seems clear after completion of this research that EBV has biological importance; he is involved in many cancer types. However, the exact mechanisms need to be clarified. Biologic diagnosis of EBV in Algeria is based on serological tests (ELISA and MNI test) that have quickly shown their limits. It seems obvious that it is necessary to integrate molecular techniques to all clinical and biological data to develop a coherent depiction of this infection. This will greatly contribute to early diagnosis but especially to have a better estimate of the viral load thereby contributing largely to improve the management of this infection in our country.

Keywords: Epstein -Barr virus, Burkitt's lymphoma, ELISA.

تدخل فيروس ابشتاين-بار في تطوير سرطان الغدد الليمفاوية (سرطان الغدد الليمفاوية مثال بوركيت)

ملخص :

فيروس ابشتاين-بار (EBV) هو من الفيروسات ذات الدنا ثنائي السلسلة يتواجد في كل مكان، يصيب أكثر من 95% من سكان العالم و لديه إمكانية كبيرة في أن يسبب ورم سرطاني غالبا ما لا يكون له أي أعراض لدى الأطفال، العدوى بين المراهقين و البالغين تشارك في التسبب في العديد من السرطانات التي تنشأ على حساب الخلايا البائية أو الخلايا الظهارية.

يعتبر هذا الفيروس هو العامل المسبب لكثرة الوحيدات العدائية ، وكثيرا ما يترافق مع أمراض السرطان مثل سرطان الغدد الليمفاوية بوركيت. يبقى دور هذا الفيروس في بدء وتوسيع هذه الأورام غير واضح. ومع ذلك، فإن تواجده في وضع نسيلي في معظم الخلايا السرطانية تشير إلى أن وجوده هو أبعد من قبيل الصدفة.

ويبدو واضحا بعد الانتهاء من هذا البحث أن EBV ، من أهمية بيولوجية معينة، يشارك في العديد من أنواع السرطان. ومع ذلك، فهذه الآليات الدقيقة تحتاج للتوضيح.

ويستند التشخيص البيولوجي ل EBV في الجزائر على الاختبارات المصلية (ELISA و اختبار MNI) الذين أظهروا بسرعة محدوديتهم. يبدو واضحا أن من الضروري دمج التقنيات الجزيئية لجميع البيانات السريرية والبيولوجية لوضع صورة متماسكة لهذه العدوى. وهذا سوف يساهم إلى حد كبير في التشخيص المبكر خصوصا من أجل أن يكون لدينا أفضل تقدير للحمل الفيروسي مما يساهم إلى حد كبير في تحسين دعم هذه العدوى في بلدنا.

الكلمات المفتاحية : فيروس ابشتاين-بار، سرطان الغدد الليمفاوية بوركيت، ELISA.

Implication du virus d'Epstein-Barr dans le développement des lymphomes (l'exemple du lymphome de Burkitt)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

L'Epstein Barr Virus (EBV) est un virus à ADN bicaténaire, ubiquitaire qui infecte plus de 95 % de la population mondiale et à fort potentiel oncogène. Souvent asymptomatique chez l'enfant, l'infection chez l'adolescent et l'adulte jeune est impliquée dans la pathogénie de plusieurs cancers qui se développent aux dépens des lymphocytes B ou des cellules épithéliales. Agent causal de la mononucléose infectieuse, il est fréquemment associé à des pathologies cancéreuses comme le lymphome de Burkitt. Le rôle du virus dans le déclenchement et l'extension de ces tumeurs reste mal connu. Cependant, son existence à l'état clonal dans la plupart des cellules cancéreuses laisse penser que sa présence est loin d'être fortuite.

Il paraît clair après la réalisation de ce travail de recherche que l'EBV, d'importance biologique certaine, est impliqué dans de nombreuses pathologies cancéreuses. Cependant, les mécanismes exacts doivent être précisés.

Le diagnostic biologique de l'EBV en Algérie est basé sur des tests sérologiques (ELISA et test MNI) qui ont rapidement montrés leurs limites. Il paraît évident qu'il est nécessaire d'intégrer des techniques moléculaires à l'ensemble des données cliniques et biologiques pour dresser un tableau cohérent de cette infection. Cela va grandement contribuer à un diagnostic précoce mais surtout d'avoir une meilleure estimation de la charge virale contribuant ainsi, en grande partie, à améliorer la prise en charge de cette infection dans notre pays.

Mots clefs : Virus d'Epstein-Barr, Lymphome de Burkitt, ELISA.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de Microbiologie, hôpital militaire Constantine.

Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UFM Constantine.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *SATTA Dalila* (PROF - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineur : *FERTOUL-GHARZOULI Razika* (MC.B - UFM Constantine).

Date de soutenance : 19/06/2016