

Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche Scientifique
Université MOULOUD Mammeri de TIZI-OUZOU
Faculté des Sciences Biologiques et Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et Microbiologie



THESE

Présentée par

ASLANE Mouna

Pour l'obtention du diplôme de

Doctorat en Sciences

Filière : BIOLOGIE

Spécialité : BIOLOGIE MOLECULAIRE ET CELLULAIRE

THEME

ETUDE DE L'INFECTION DU VIRUS D'EPSTEIN-BARR
DANS LE CANCER GASTRIQUE EN ALGERIE

Soutenue publiquement le :

DEVANT LE JURY :

Président	MATI MOULTI Farida	Professeur, UMMTO
Directeur	HOUALI Karim	Professeur, UMMTO
Co-Directeur	YAYLIM-ERALTAN İlhan	Professeur, Université d'Istanbul Turquie
Examineurs	ZERROUG MOHAMED Mihoub	Professeur, Université de Sétif
	HAMIDOUCHE Zahia	Maitre de conférences, UMMTO
	CHERBAL Farid	Professeur, Université d'Alger

DEDICACE

A la mémoire de mon père

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai
toujours eu pour toi.*

*Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma
formation. « Rahemaka Allah »*

A ma très chère mère

*Je te dédie ce travail en témoignage de ma gratitude,
ma profonde affection et mon profond respect.*

Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

À mes chers frères et à ma sœur, sans vous je n'aurais jamais réussi à arriver à ce stade-là.

À mon mari et à mes enfants, Merci de m'avoir soutenu

Ce travail vous est dédié avec tout mon amour

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon directeur de thèse le Professeur HOUALI Karim pour la confiance qu'il m'a témoignée en acceptant la direction scientifique de mes travaux. Les mots me manquent pour vous exprimer ma gratitude et ma reconnaissante de m'avoir soutenu dans les moments difficiles. Vous avez su m'apporter un soutien constant, une écoute, une confiance et des conseils précieux et avisés à la hauteur de vos compétences et vos réelles qualités humaines sans égal. Vous avez fait plus qu'il ne fallait pour moi et sachez que sans votre aide ce travail n'aurait jamais vu le jour. Soyez assuré de ma profonde gratitude. MERCI pour tous Monsieur HOUALI

Mes vifs remerciement vont à Madame le Professeur BRAND-SABERI Beate et le Professeur ALHAJ Abdulatif qui m'ont donné la chance et le plaisir d'effectuer ce travail dans le laboratoire « Anatomie et Embryologie Moléculaire » de la faculté de Médecine Université Ruhr, Bochum, Allemagne. Je remercie très chaleureusement tous les membres du laboratoire. Merci Abdulatif pour toute l'aide, les efforts et les sacrifices que tu m'as apporté pour réaliser ce travail. Merci pour ton inaltérable gentillesse, tes conseils mettant une grande utilité dans l'accomplissement de mes taches.

Je suis très honoré à remercier de la présence à mon jury de thèse et je tiens à remercier Madame MATI MOULTI Farida Professeure à la Faculté des sciences Biologiques et des sciences Agronomiques de l'université Mouloud MAMMERI de Tizi-ouzou, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse.

Je remercier vivement, pour l'honneur qu'ils me font, les rapporteur de ma thèse, Messieurs CHERBAL Farid Maitre de conférences à l'université d'Alger et ZERROUG MOHAMED Mihoub Professeur à l'université de Sétif ainsi que madame HAMIDOUCHE Zahia Maitre de conférences à l'université de Tizi-Ouzou de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'apporter toute votre connaissance et expérience pour améliorer ce travail. Je tiens à vous exprimer ma plus profonde reconnaissance.

J'exprime tous mes remerciements à Docteur Akila HENEB pour son chaleureux accueil au sein du laboratoire d'Anatomo-Pathologie du CHU NEDIR Mohemmed de Tizi-

ouzu. Merci de m'avoir fait bénéficier tout au long de ce travail de votre grande compétence, de votre rigueur intellectuelle, de votre dynamisme malgré vos nombreuses charges. Je remercie également l'ensemble des membres de son équipes qui ont contribué à l'acquisition des échantillons ainsi que l'assistance technique qui m'ont permis de faire un bon travail d'immunohistochimie.

Je remercie également le chef du service de chirurgie générale du CHU de Tizi-ouzu qui a bien voulu nous fournir les biopsies et les sérums sanguins.

J'adresse toute ma gratitude à tous mes ami(e)s et à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail. Je remercie très particulièrement mon amie Guendouzi Salima pour m'avoir aidé et encouragé, et pour m'avoir changé les idées quand j'en avais besoin.

Je remercie enfin tous les enseignants de la faculté de Biologie-Agronomie en particulier Madame Iratni, Madame Landri et M^{elle} Ben Ahmed Djilali pour les encouragements incessants et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

RESUME

Résumé:

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) est associé à une variété de malignités humaines y compris le cancer gastrique (CG). Il n'existe aucune étude sur l'association de l'EBV avec le CG en Algérie qui est une région endémique pour le cancer du nasopharynx associé à l'EBV. La protéine de latence membranaire LMP-1 est considéré comme l'oncogène majeur pour l'EBV cela par son pouvoir immortalisant et transformant de plusieurs types cellulaires, son expression dans les CG associés à l'EBV (CGaEBV) est largement discutée. Ce travail a été réalisé afin d'étudier la présence et la prévalence de l'EBV dans le CG provenant de patients Algériens, et de rechercher l'expression de LMP-1 dans les cas de CGaEBV et enfin de rechercher des marqueurs sérologiques de diagnostic pour cette pathologie; 97 cas sélectionnés de carcinomes gastriques, 6 cas de lésions précancéreuses présentant des dysplasies et 10 cas de tissus non néoplasiques montrant des gastrites ont été examinés pour rechercher une infection par l'EBV. La recherche des petits ARN codés par l'EBV (EBER-1 et EBER-2) a été effectuée sur tous les cas sélectionnés en utilisant des sondes PNA par hybridation in situ en fluorescence (FISH). L'expression de LMP-1 a été évaluée dans les cas de CG EBV positifs en utilisant deux techniques d'immuno-marquages, l'immunofluorescence (IF) et l'immunohistochimie (IHC) et deux anticorps anti LMP-1 différents. Afin de confirmer les résultats nous avons procédé à la recherche simultanée des EBERs et LMP-1 sur 15 cas de CG. Pour cela un double marquage à IF pour LMP-1 et FISH pour EBERs a été appliqué sur des coupes de tissus tumoraux. D'autre part, la présence de LMP-1 a été analysée dans les sérums de 20 patients atteints de CG par le test ELISA, comparais à son expression dans 20 échantillons d'individus sains. Les résultats obtenus montrent que 22 sur 97 cas de CG (22,7%) ont été EBV positifs par FISH, et 2 cas sur 6 de dysplasies gastrique ont été positifs pour les EBERs ainsi tous les cas non néoplasiques ont négatifs pour les EBERs. L'expression des EBERs a été nucléaire dans toutes les cellules épithéliales malignes et absentes dans les cellules normales. Les cas de CGaEBV présentent des caractéristiques clinico-pathologiques particulières qui sont la prédominance chez les patient d'âge entre 45 et 60 ans et au faible degré de la différenciation tumorale. En outre, la LMP-1 a été exprimée dans 8/22 cas de CG EBV-positifs. L'expression a été membranaire et cytoplasmique, limitée aux cellules malignes et absente dans les tissus non néoplasiques. Le double marquage pour LMP-1 et EBERs a déterminé une co-localisation des deux marqueurs au niveau des cellules malignes gastriques. Le test ELISA a été positif pour LMP-1 dans 50% des sérums provenant de patients souffrant de GC en Algérie, tandis que les sérums provenant de donneurs sains ont été négatifs. Nous avons montré une haute fréquence des CGaEBV en Algérie égale à 22,7%, ces cas présentent des caractéristiques clinico-pathologiques spécifiques. De plus, l'expression de LMP-1 indique que l'EBV est présent dans les cellules infectées de façon latente et que cette protéine peut avoir un rôle important dans la carcinogenèse du CGaEBV. LMP-1 peut former un bon marqueur de diagnostic pour ce type de tumeur.

Mots clés : Cancer gastrique, Epstein-Barr virus, EBERs, LMP-1.

Abstract:

Epstein-Barr virus (EBV) is associated with a variety of human malignancies, including gastric carcinoma (GC). There has been no study about the presence and the prevalence of Epstein-Barr virus in gastric carcinoma in Algeria an endemic area of nasopharyngeal carcinoma associated to EBV. The present study was carried out to investigate the prevalence of EBV associated GC (EBVaGC) among Algerian patients, to define EBV latency patterns in GC and to find a new diagnostic marker for this malignancy. 97 cases selected of gastric carcinomas, 6 cases of precancerous lesions showing dysplasia and 10 cases of non-neoplastic tissues showing gastritis were examined for EBV infection using fluorescence in situ hybridization assay to detect EBV-encoded small RNAs (EBER-1 and EBER-2). The expression of LMP-1 was evaluated in EBV positive cases with specific monoclonal antibodies using immunofluorescence and immunohistochemistry techniques. Combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization was carried out in 15 gastric carcinoma cases to confirm the presence of EBERs and LMP-1 simultaneously. Furthermore, LMP-1 was analyzed in the sera of 20 patients with GC by ELISA compared to its expression in 20 samples of healthy individuals. We have shown that 22 out of 97 cases (22.7%) expressed EBV. EBERs were present within the malignant epithelial cells and in precancerous lesions, but in none of non-neoplastic cases, we also found that EBVaGC associated with age of patients, and with tumor differentiation. In addition, LMP-1 was expressed in 8 of 22 EBV-positive simples. The expression was membranous/cytoplasmic, restricted to the malignant cells and absent in non-neoplastic tissues. Combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization determined a colocalisation of EBERs and LMP-1 in gastric carcinoma cells. Moreover, LMP-1 ELISA was positive in 50% of sera derived from patients with GC from Algeria, whereas, sera from healthy donors were negative. We conclude that the prevalence of EBVaGC is 22.7 % in Algeria with specific clinicopathologic features, the high rate of EBV in gastric carcinoma suggests that EBV plays an important role in tumorigenesis and the infection can precedes transformation. Moreover, LMP-1 expression indicates that EBV is present in latently infected cells, this protein can be necessary in the carcinogenesis of EBVaGC and it will be a good diagnostic marker for this type of tumor.

Key words:

Epstein-Barr virus, gastric carcinoma, EBERs, LMP-1.

SOMMAIRE

DEDICASES
REMERCIEMENTS
RESUMES
LISTE DES FIGURES
LISTE DES TABLEAUX
SOMMAIRE
ABREVIATIONS

INTRODUCTION GENERALE

1. LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR.....	4
1.1 Généralité sur le virus d'Epstein-Barr	4
1.1.1 Historique.....	4
1.1.2 Classification du virus d'Epstein-Barr.....	5
1.1.3 Structure du virion	7
1.1.4 Structure et Organisation du génome viral	7
1.1.5 Polymorphisme	9
1.1.6 Les voies de transmission	10
1.1.7 Tropisme cellulaire	11
1.2 Physiologie de l'infection par le Virus d'Epstein-Barr	11
1.2.1 Attachement et pénétration du virus de l'EBV dans les cellules cibles	11
1.2.1.1 Infection des lymphocytes B.....	11
1.2.1.2 Infection des cellules épithéliales	12
1.2.2 Persistance du génome viral dans l'organisme	15
1.3 Infection latente, maintien du génome.....	16
1.3.1 Les produits des gènes de latence	19
1.3.1.1 Les protéines nucléaires EBNAs.....	19
1.3.1.1.1 EBNA-1	19
1.3.1.1.2 EBNA-2	20
1.3.1.1.3 EBNA-LP	22
1.3.1.1.4 La famille d'EBNA-3.....	22
1.3.1.2 Les protéines de latence membranaire LMPs.....	24
1.3.1.2.1 LMP-1	24
a. Structure, synthèse et localisation subcellulaire.....	24
b. Voies de signalisations	25
c. Les fonctions de LMP-1	27
1.3.1.2.2 LMP-2	30
1.3.1.3 Les ARN viraux (EBERs et microARNs).....	33
1.3.1.3.1 Les EBERs	33
a. Structure et localisation	33
b. Interactions protéiques et rôles d'EBERs.....	34

1.3.1.3.2 Les microARNs (miARNs)	36
1.4 L'infection lytique	39
1.4.1 Les protéines très précoces (<i>Immediate Early Antigens</i> , IEA)	39
1.4.2 Les protéines précoces (<i>Early Antigens</i> , EA)	40
1.4.3 Les protéines tardives	41
2. LE CANCER GASTRIQUE ASSOCIE AU VIRUS D'EPSTEIN-BARR	
2.1 Le cancer gastrique	43
2.1.1 Données épidémiologiques	43
2.1.2 Anatomie et organisation histologique de l'estomac	46
2.1.3 Les lésions précancéreuses	47
2.1.4 Classification des tumeurs gastriques	48
a. Classification de Lauren	49
b. Classification de L'OMS	50
c. Classification de TCGA	54
2.1.5 Facteurs de risque	55
a. Infections par <i>Helicobacter pylori</i>	55
b. Facteurs alimentaires	56
c. Facteurs héréditaires et génétiques	58
d. Facteurs liés aux habitudes de vie, à la consommation d'alcool et au tabagisme	60
e. Conditions pathologiques et lésions précancéreuses	60
f. Infection par le virus d'Epstein-Barr	61
2.2 Cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr	
2.2.1 Définition	61
2.2.2 Caractéristiques épidémiologiques du cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr	62
2.2.3 Caractéristique clinico-pathologiques du cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr	63
2.2.4 Oncogenèse induite par le virus d'Epstein-Barr dans les cellules épithéliales gastriques	65
2.2.4.1 Intégration virale	65
2.2.4.2 Maintien de l'ADN clonal dans le cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr	66
2.2.4.3 Interactions du virus d'Epstein-Barr et de l'hôte au niveau moléculaire	67
a. Rôles des gènes de latence	67
b. Régulations épigénétiques des gènes viraux et des gènes de l'hôte	71
c. Rôles des microARNs viraux et de l'hôte	72
2.2.4.4 Altérations génomiques et expression des gènes dans les cancers gastriques associées au virus d'Epstein-Barr	74
3 MATERIELS ET METHODES	
3.1 Détection du virus d'Epstein-Barr virus dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses	76

3.1.1 Matériels	77
3.1.2 Méthodes	79
3.1.2.1 Hybridation in situ en fluorescence (FISH)	79
3.1.2.2 Hybridation in situ chromogénique (CISH)	81
3.1.2.3 Analyse statistique.....	81
3.2 Étude de l'infection latente de l'EBV dans le cancer gastrique.	
Détection de l'expression de LMP-1.....	82
3.2.1 Matériels	82
3.2.2 Méthodes.....	83
3.2.2.1 Immunofluorescence	83
3.2.2.2 Double marquage à immunofluorescence	84
3.2.2.3 Immunohistochimie.....	85
3.2.2.4 Double marquage à immunofluorescence et hybridation in situ en fluorescence	85
3.3 Détection de la protéine LMP-1 dans le sang des patients atteints de cancer gastrique par le test ELISA.....	86
3.3.1 Matériels	86
3.3.2 Méthodes.....	87
3.3.3 Analyse statistique.....	87

4 RESULTATS ET DISCUSSION

4.1 Résultats et discussion de l'étude : Détection du virus d'Epstein-Barr virus dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses	89
4.1.1 Résultats.....	89
4.1.1.1 Description de la population d'étude, caractéristiques cliniques et pathologiques.....	89
4.1.1.2 Détection de l'EBV dans les tissus gastriques. Statut et fréquence des EBERs par Hybridation in situ en fluorescence.....	92
4.1.1.3. Caractéristiques cliniques et pathologiques des cas de cancer gastrique EBV positifs	95
4.1.1.4. Détection de l'EBV par hybridation in situ chromogénique dans les tissus gastriques	98
4.1.2. Discussion	100
4.1.2.1 Prévalence du virus d'Epstein-Barr dans le cancer gastrique en Algérie.....	102
4.1.2.2 Validation des techniques d'étude.....	101
4.1.2.3 Signification des caractéristiques cliniques et pathologiques des cas de cancer gastriques EBV positifs	104
4.1.2.4 Signification biologique de la présence de l'EBV dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses	107
4.2 Résultats et discussion de l'étude : Étude de l'infection latente de l'EBV dans le cancer gastrique. Détection de l'expression de LMP-1	110
4.2.1 Résultats	110

4.2.1.1	Détection de LMP-1 par immunofluorescence et double marquage à immunofluorescence	110
4.2.1.2	Détection de LMP-1 par immunohistochimie.....	112
4.2.1.3	Recherche simultanée d'EBERs et LMP-1 par double marquage à immunofluorescence et hybridation in situ en fluorescence.....	113
4.2.2	Discussion	115
4.2.2.1	Révélation de la LMP-1 par immunofluorescence, double immunofluorescence et immunohistochimie	115
4.2.2.2	Révélation simultanée d'EBERs et LMP-1 par double marquage FISH et IF	118
4.3	Recherche de la LMP-1 dans le sérum des patients atteints de cancer gastrique par ELISA.....	119
4.3.1	Résultats	119
4.3.2	Discussion	121
CONCLUSION GENERALE		124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Taxonomie des <i>Herpesviridae</i>	6
Figure 1.2 : Structure du virion d'EBV.....	7
Figure 1.3 : Schéma représentatif de l'organisation du génome de l'EBV.....	8
Figure 1.4: Mécanisme d'attachement et de fusion de l'EBV au lymphocyte B.....	12
Figure 1.5 : Comparaison entre l'infection directe et infection par contacte celle-à-cellules	15
Figure 1.6 : Schéma représentant le cycle de vie d'EBV de la primo-infection vers la persistance et la malignité	18
Figure 1.7 : Structure de LMP-1	24
Figure 1.8 : Activation des voies de signalisation cellulaire par LMP-1.....	26
Figure 1.9: Activation des voies de signalisation cellulaire par LMP-2.....	31
Figure 1.10: Structure secondaires des EBER-1 et EBER-2	33
Figure 1.11: Le labyrinthe des interactions des EBERs dans les cellules infectées par EBV	36
Figure 1.12 : Biosynthèse et modalité d'action des microARN	37
Figure 2.13 : Les taux d'incidences et de mortalité normalisés selon l'âge pour 100 000 habitants estimés pour le cancer gastrique dans le monde en 2012	44
Figure 2.14 : La mortalité due au cancer de l'estomac dans le monde estimée en 2012	45
Figure 2.15 : Représentation schématique des différentes parties de l'estomac.....	47
Figure 2.16 : Coupes histologique observées dans les étapes de la progression d'une gastrite vers un cancer dans un modèle murin résumant « la cascade Correa »	49
Figure 2.17: Coupe histologique des deux types de cancer gastrique distinguées selon la classification de Lauren.....	50
Figure 2.18 : Modèle de dentelle caractéristique du cancer gastrique associé à l'EBV de stade précoce.....	64
Figure 2.19 : Détection de l'infection monoclonale et polyclonale de l'EBV dans le cancer gastrique	67
Figure 2.20 Schéma de l'oncogenèse virale chez les CGaEBV	73
Figure 3.21 : Structure chimique de l'ADN et de PNA	78
Figure 4.22: Répartition selon le sexe et les tranches d'âge des patients sélectionnés atteints de cancer gastrique.....	89

Figure 4.23 : Comparaison des pourcentages des cas de CG EBV+ et EBV- de type adénocarcinome gastrique (ADK) versus le type Lymphoepithelioma-Like Carcinoma (LELC).....	92
Figure 4.24: Détection des EBERs par hybridation in situ en fluorescence dans le cancer gastrique	93
Figure 4.25 : Adénocarcinome gastrique peu différencié EBERs positif par FISH combiné avec la méthode de contraste de phase	94
Figure 4.26 : Répartition des cas EBV+ et EBV- selon les tranches d'âges et le degré de différenciation	95
Figure 4.27: Détection du virus Epstein-Barr par la technique de CISH	99
Figure 4.28 : Comparaison entre la détection des EBERs par la FISH et la CISH sur un cas d'adénocarcinome gastrique tubulaire bien différencié	99
Figure 4.29: Analyse d'expression de LMP-1 par immunofluorescence sur coupe de paraffine de tissu épithéliale gastrique	111
Figure 4.30 : Double coloration à immunofluorescence pour LMP-1 et la cytokeratine dans un adénocarcinome gastrique bien différencié	111
Figure 4.31: Détection de LMP-1 par immunohistochimie sur des coupes de tissus d'épithélium gastrique	112
Figure 4.32: Double coloration par IF pour LMP-1 et FISH pour EBERs sur des coupes en paraffine de tissus tumoraux gastriques.....	114
Figure 4.33: Détection de LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum de patients atteints de CG	120
Figure 4.34 : Détection de LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum des sujets sains	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Le rôle des différents gènes latents codés par l'EBV pendant la latence et le développement tumorale	39
Tableau 2.2 : Comparaison entre les deux systèmes de classification du cancer gastrique OMS et Lauren	52
Tableau 2.3a : Les différents stades du cancer gastrique basés sur la classification TNM.....	53
Tableau 2.3b : Classification clinique TNM des tumeurs de l'estomac	54
Tableau 2.4: Principales caractéristiques génomiques des quatre classes moléculaires du cancer gastrique proposées par TCGA	55
Tableau 2.5 : Rôles des protéines de latences dans le CGaEBV	71
Tableau 4.6: Caractéristiques clinico-pathologiques de tous les malades sélectionnés	90
Tableau 4.7: Distribution des sous type histologique des cas de cancer gastrique sélectionnés selon le sexe.....	91
Tableau 4.8 : Les caractéristique cliniques et pathologiques des maladies EBV+ et EBV-	96
Tableau 4.9 : Répartition des cas de cancer gastrique EBV positifs selon le sous type histologique et le sexe	97
Tableau 4.10 : Comparaison entre les résultats de la FISH et la CISH pour la détection des EBERs sur 9 cas de CG	98
Tableau 4.11 : Effectifs des cas de CG après le double marquage pour EBERs et LMP-1	113

ABBREVIATIONS

A.

aa : acide aminé
 ADN : acide désoxyribonucléique
 AICR: American Institute of Cancer Research
 AIRC /OMS : Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer/Organisation Mondiale de la Santé
 APC: Adenomatous polyposis coli
 ARN: acides ribonucléiques
 ARNm : ARN messager
 AJC : Association Japonaise contre le Cancer.
 ATF/CRE: Activating Transcription Factor/Cyclin AMP Response element
 ATF: Activating Transcription Factor

B.

Bak: Bcl2-homologous antagonist killer
 BARF-1: BamHI A right frame 1
 BART: BamHI A region rightward transcripts
 Bax: Bcl2-activated X
 Bcl2: B-cell lymphoma type 2
 BCR: B-cell Receptor antigen complex
 BHRF-1: Bam HI fragment H rightward open reading frame 1
 BL : Burkitt Lymphoma
 bp : paire de bases
 BS : Butyrate de Sodium
 BSA: Bovine Serum-Albumine

C.

CagA: Cytotoxin-associated gene A
 CAK: Cdk Activating Kinase
 Caspase: Cysteine-specific protease
 CBP: CREB Binding Protein
 CCC: Covalently Closed Circle
 CDK: Cyclin Dependent Kinase
 CDKI: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor
 CG: Cancer Gastric
 CGaEBV: Cancer Gastric associé au Virus d'Epstein-Barr
 CIP: cdk-interacting protein
 CISH: Chromogenic In Situ Hybridization

CMH: Complexe Majeure d'histocompatibilité
 CMV: *Cytomegalovirus*
 CRE : Cyclin AMP Response element
 CTAR: Carboxyl-Terminal Activating Region

D.

dNTP: desoxynucleosides triphosphate
 DNMT1: DNA Methyltransferase 1

E.

EA: Early Antigen
 EBER: EBV-encoded RNA
 EBNA: Epstein-Barr Nuclear Antigen
 EBNA-LP: Epstein-Barr Nuclear Antigen-Leader Protein
 EBV: Epstein-Barr virus
 EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid
 EGF: Epidermal Growth Factor
 EGF-R: Epidermal Growth Factor Receptor
 ELISA: Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay

F.

FADD: Fas-Associated Death Domain
 FDA: Food and Drug Administration
 FISH: Fluorescence In Situ Hybridization
 FITC: Fluorescein isothiocyanate
 FMRC: Fonds Mondial de Recherche sur le Cancer

G.

GADD: Growth Arrest on DNA Damage

H.

HD: Hodgkin Disease
 HDGC: Hereditary Diffuse Gastric Carcinoma
 HHV: *Human Herpes Virus*
 HLA: Human Leukocyte Antigen
 Hp : *Helicobacter pylori*
 HRP: Horseradish peroxidase
 HSV: Herpes Simplex Virus

I.

IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
 IARC International Agency for Research on Cancer
 LCT: Lymphocyte T Cytotoxique
 IEA: Immediate Early Antigens
 IF: Immunofluorescence
 IFN: Interferon
 Ig: Immunoglobuline
 IgA: Immunoglobuline A
 IgE : Immunoglobuline E
 IgG : Immunoglobuline G
 IHC : immunohistochimie
 IL: Interleukine
 IR: Internal Repeat
 IRF3: interferon regulatory transcription factor 3
 IRF7: interferon-regulatory factor 7
 ISH: In Situ Hybridization
 ISRE: Interferon Stimulated Response Element
 ITAM: Immunoreceptor Tyrosin Based Activating Motif
 ITAM: Immunoreceptor Tyrosin based Activating Motif

J

JAK : Janus kinase
 JNK: c-Jun-N-terminal-Kinase

K.

kDa kilo-Dalton
 Kpb: kilo-paire de base

L.

L: Late region
 LB : Lymphome de Burkitt
 LCL : lignées cellulaire lymphoïdes
 LELC: lymphoepithelioma-like carcinoma
 LH : Lymphome de Hodgkin
 LMP : Latent Membrane Protein
 LP : Leader Protein
 LTC : lymphocytes T cytotoxiques
 lyLMP1: Lytic LMP1
 LB: Lymphocytes B
 M : Molar = 1 mol/L

M.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase

miARN: micro-ARN

MNI: Mononucléose infectieuse

N.

NF-κB: Nuclear factor kappa
 immunoglobulin enhancer binding protein
 NGS: Next-Generation Sequencing
 NK: Natural Killer
 NPC: Nasopharyngeal Carcinoma
 NT: N-terminal

O.

OMS: Organisation Mondiale de la Santé
 ORF: Open Reading Frame
 OriLyt: Lytic replication origin
 OriP : Plasmidic replication origin

P.

Pap : adénocarcinome papillaire
 PAF : Polyposé Adénomateux Familial
 pb : paire de bases
 PBS: Phosphate Buffer Saline
 PCR: Polymerase Chain Reaction
 PD-L: Programmed Death-Ligand
 PI3K: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase
 PKA: Protein Kinase AMPc dépendant
 PKN: Protein Kinase N
 PKR: Protéine Kinase RNA dépendantes
 PM: Poids Moléculaire
 PML: Promyelocytic leukemia protein
 PML-NBs: promyelocytic leukemia nuclear bodies
 PNA: Peptide Nucleic Acid
 pRb: Retinoblastoma protein
 PTEN: Phosphatase and tensin homolog
 PTK: Protein Tyrosine Kinase
 PUMA: p53- Up-regulated Modulator of Apoptosis
R.
 RBP-Jκ: Recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region
 RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism
 RIG-I: Retinoic acid-inducible gene 1
 RIP: Receptor interacting protein
 RLU: Relative Light Unit
 RT : Reverse Transcriptase
 RT-PCR : Reverse Transcriptase-PCR

S.

SCC: Squamous-Cell Carcinoma

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

Sig: signet ring cells

STAT: Signal transducers and activators of transcription

SWI/SNF: SWItch/Sucrose Non-Fermentable

T.

TCGA: The Cancer Genome Atlas

TE: Tris-EDTA

TES: Transfection Effector Site

TGF: Transforming Growth Factor

TLR: Toll-like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNFR: Tumor necrosis factor receptor

TNM: Tumeur, Nodules, Metastases

TR: Terminal Repeat

TRADD: TNF Receptor Associated Death Domain

TRAF: TNF Receptor Associated Factor

Tub1 : adénocarcinome tubulaire bien différencié

Tub2 : adénocarcinome

tubulairemoyennement différencié

U.V.X.Y.Z.

UICC : Union International on le cancer

UL: Long Unique Region

US: Short Unique Region

URR: Upstream Regulatory Region

VacA: vacuolating cytotoxin A

VCA : Viral Capsid Antigen

VZV : Virus varicelle-zona

ZEBRA : BamHI Z Epstein-Barr virus Replication Activator

Zta/ZEBRA : Z transactivator/Z Epstein-Barr replication activator

INTRODUCTION GENERALE

Le virus d'Epstein-Barr (EBV), première cause de tumeurs humaines d'origine virale, a été découvert il y a plus de 50 ans. Ce virus est considéré comme un agent pathogène oncogène de classe 1 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Il infecte la grande majorité de la population mondiale, et établit des infections latentes à vie. L'EBV a été étroitement lié au développement d'une large gamme de tumeurs malignes humaines d'origines lymphoïde et épithéliale, telles que le lymphome de Burkitt, la maladie de Hodgkin, le cancer du nasopharynx (NPC) et le cancer de l'estomac.

La présence de l'EBV dans le cancer gastrique (CG) a été détectée pour la première fois par Burke et al. (1990), dans une forme rare appelée carcinome indifférencié à stroma lymphoïde, identique au NPC. Plus tard, il a été montré que tous les autres types histologiques pouvaient être associés à l'EBV (Shibata et Weiss., 1992). Cette association est basée d'une part sur la présence de produits viraux clonaux dans les cellules tumorales gastriques, et d'autre part sur des taux d'anticorps anti-EBV élevés dans les sérums pré-diagnostiques. La détection, par hybridation in situ (ISH), de petits ARNs encodés par l'EBV (EBER-1 et EBER-2), est devenue le test de référence pour le dépistage de l'EBV dans les CG, et ce en raison de leur forte abondance dans toutes les cellules tumorales (10^7 molécules/cellule), et de leur absence dans les cellules normales (Gulley, 2001).

La fréquence des CG infectés par l'EBV varie de 2 à 20%, avec une moyenne de 10%, ce qui en fait forme le plus large groupe de tumeur associée à l'EBV répartie dans le monde. Son incidence est caractérisée par une importante disparité géographique; elle est élevée dans certains pays occidentaux comme l'Allemagne et les États-Unis, alors qu'elle est plus faible dans la plupart des pays européens, en Amérique du Sud et en Asie (Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)). De plus, les CG associés à l'EBV (CGaEBV) présentent des caractéristiques clinico-pathologiques, épigénétiques et moléculaires distinctes ; la nouvelle classification effectuée par le (Cancer Genome Atlas Research Network (2014) les classe comme l'un des quatre sous-types moléculaires du CG.

Presque exactement vingt ans après la découverte de l'EBV, la protéine LMP-1 (latent membrane protein-1) est entrée dans la gamme des protéines de latence de l'EBV, et peu de temps après, elle a été reconnu comme le premier produit génique transformant du virus.

LMP1 est exprimé dans la plupart des maladies lymphoprolifératives associées à l'EBV et des tumeurs malignes, et elle contribue de manière critique à la pathogenèse et aux phénotypes de la maladie (Kieser et Sterz., 2015). Cependant, son expression dans le CG est contestée, certaines études suggérant qu'elle n'est que peu ou pas exprimée dans ce type de cancer, et que son rôle n'est pas important dans la carcinogénèse gastrique, alors que d'autres supportent sa présence et son rôle dans la transformation tumorale des cellules épithéliales gastriques (Ribeiro et al., 2017).

Le cancer de l'estomac demeure un problème de santé publique majeur malgré la baisse du taux d'incidence mondial. Près d'un million de nouveaux cas sont recensés chaque année dans le monde, ce qui en fait la cinquième malignité la plus fréquente, et la troisième cause de décès par cancer (Ferlay et al., 2015). L'Algérie est une région à risque intermédiaire pour le CG, avec 1430 nouveaux cas chaque année ; en termes de fréquence, le CG est en cinquième position chez l'homme et en neuvième position chez la femme. D'autre part, l'Algérie est une région endémique pour les pathologies liées à l'EBV, principalement dans le contexte du NPC. Cependant, il n'existe aucune étude concernant l'infection par l'EBV dans le CG dans cette région.

La première partie de ce travail de thèse porte sur la détection de l'EBV chez des patients algériens à différents stades de la carcinogénèse gastrique. Chaque prélèvement effectué a subi au préalable une analyse anatomo-pathologique qui a permis de confirmer le type histologique de la tumeur, le stade et le grade de la malignité. Le dépistage de l'EBV est ici basé sur la détection de l'expression de l'EBER-1 et EBER-2 par hybridation in situ en fluorescence (FISH) sur des coupes tissulaires fixées au formol et enrobées en paraffine. Cette étude détermine la fréquence des cas de cancers gastriques infectés par l'EBV en Algérie ainsi que les caractéristiques clinico-pathologiques de cette cohorte. Des prélèvements à partir de lésions précancéreuses et d'autres présentant une simple inflammation de l'estomac ont servi de contrôle. Le dépistage de l'EBV sur ces prélèvements a été réalisé également afin d'essayer de comprendre la physiologie de l'infection de l'épithélium gastrique par l'EBV.

Nous avons aussi appliqué la technique d'hybridation in situ chromogénique (CISH) pour la détection des EBERs. Le test a été effectué sur des échantillons EBV positifs par la FISH, son intérêt est de confirmer les résultats de la FISH et ainsi la sensibilité et la spécificité des deux techniques à dépister l'EBV dans le cancer gastrique.

La deuxième partie de ce travail de thèse est consacrée à la recherche de marqueurs moléculaires pour le CGaEBV. Pour se faire, nous avons ciblé la protéine LMP-1, l'oncogène majeur de l'EBV. Il s'agit ici d'une part de détecter LMP-1 dans le CG, et d'autre part

d'analyser le rôle de cette protéine dans le développement des CGaEBV. La recherche de l'expression de LMP-1 est effectuée sur les sections tissulaires EBV positives par l'utilisation de deux techniques immunologiques. La détection simultanée des ARN viraux et du produit de gènes viraux est le meilleur moyen pour confirmer la présence d'une infection par l'EBV. Ainsi, nous avons procédé à la recherche simultanée des EBERs et de LMP-1 sur des coupes tissulaires par un double marquage, FISH et immunofluorescence (IF).

Dans la dernière partie de ce travail, nous avons analysé la sécrétion de LMP-1 dans les sérums de patients atteints de CG par le test ELISA, comparés aux prélèvements d'individus sains. Ainsi, nous avons montré que la présence de LMP-1 dans le sang des patients pouvait servir de marqueur sérologique fiable et spécifique pour le diagnostic du CGaEBV dans les populations à risque élevé.

CHAPITRE 1

LE VIRUS D'EPSTEIN-BARR

1.1. Généralité sur le virus d'Epstein-Barr

1.1.1. Historique

Les connaissances actuelles reliant l'infection à certains agents biologiques et la carcinogenèse chez l'homme est le résultat d'une longue et laborieuse mais passionnante succession de découvertes scientifiques, qui a débuté il y a plus d'un siècle. Ces importantes étapes historiques ont été entièrement retracées par le Dr Harald zur Hausen dans son récent livre « Infections Causing Human Cancer., 2006) dont cette partie qui a extraie quelques faits saillants sur l'historique du virus d'Epstein-Barr.

En 1958, un chirurgien britannique, Dennis Burkitt, a décrit un lymphome spécifique de l'enfance en Afrique équatoriale n'ayant lieu que dans des régions géographiques spécifiques: il fut par la suite appelé lymphome de Burkitt (Burkitt., 1958). Parce que ces régions coïncident avec les zones de paludisme endémique, Burkitt spécula que cette tumeur devrait avoir une étiologie infectieuse, probablement véhiculée par un arthropode, éventuellement par un moustique (Burkitt, 1962).

Burkitt exposa ses résultats au « *Middlesex Hospital* » de Londres, et attira la curiosité d'Anthony Epstein, Burt Achong et Yvonne Barr, qui décidèrent de rechercher la présence d'un agent infectieux au sein de ces cellules tumorales. Ils réussirent à mettre en culture les cellules provenant des tumeurs de Burkitt et en dérivèrent des lignées permanentes de lymphocytes B se multipliant indéfiniment in vitro. Après observation d ces lignées par microscopie électronique, Epstein et Barr y découvrirent un nouveau virus ayant la morphologie des herpes virus.

En mars 1964, la revue médicale Lancet publia les résultats de la recherche pionnière de ces trois scientifiques, relatant la découverte du premier virus humain responsable d'un cancer. Ce virus a par la suite porté le nom de deux de ces chercheurs, et est devenu le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Epstein et al., 1964).

En 1966 et grâce au développement de l'immunofluorescence, Gertrude Henle et son équipe observèrent des titres d'anticorps hautement élevés contre les antigènes de l'EBV chez des patients atteints de lymphome de Burkitt (Henle et Henle, 1966). En 1968, le groupe de Henle mirent au point un test sérologique qui démontra que la majorité de la population adulte possède des anticorps contre ce virus. Par la suite, l'observation d'une technicienne du laboratoire séropositif et présentant une mononucléose infectieuse (MNI) leur suggéra que l'EBV était l'agent causal de la MNI (Henle et al., 1968).

Les premiers signes d'un potentiel oncogène de l'EBV fur détecter après l'obtention d'une lignées lymphoblastoïdes provenant d'une co-culture du sang du cordon ombilical avec des

cellules du lymphome de Burkitt (Henle et al., 1967). Ces résultats furent confirmés après la découverte de l'ADN viral persistant dans des cellules de lymphome de Burkitt (zur Hausen et Schulte-Holthausen, 1970), ainsi que dans des biopsies du NPC (zur Hausen et al. 1970 ; Wolf et al., 1973). L'induction de lymphome après inoculation de l'EBV chez des marmousets (Shope et al., 1973) ou des singes hiboux (Epstein et al., 1973) confortèrent l'hypothèse de l'EBV comme un agent oncogène.

Dans les années 1980 et 1990, plusieurs études démontrèrent que ce virus est associé à d'autres pathologies malignes telles que la maladie de Hodgkin, les lymphomes à cellules T/NK et les lymphomes développés chez des individus immunodéprimés ou transplantés et d'autres tumeurs épithéliales telles que le cancer gastrique. Toutes ces tumeurs sont caractérisées par la présence de multiples copies extra-chromosomiques du génome circulaire viral. Lors de cette période, toutes les protéines de latence virale ont été mises en évidence, ces protéines contribuent au caractère oncogène de ce virus (Rickinson and Kieff., 2001).

1.1.2. Classification du virus d'Epstein-Barr

L'EBV fait partie d'une très grande famille composée de plus de 120 virus connus, au spectre d'hôte relativement large (mammifères, oiseaux, amphibiens, reptiles, poissons).

Cette grande diversité est une conséquence du système de classification, basé sur les ressemblances structurelles des virions : structure icosaédrique de la capside, ADN linéaire double brin, présence d'une enveloppe glycoprotéique. En plus de ces caractéristiques structurelles, tous les herpès virus partagent quelques propriétés biologiques importantes, dont la plus remarquable est la capacité d'établir une infection dite latente. En effet, après la primo infection, les virions persistent tout au long de la vie, dans les cellules « réservoirs » de l'hôte. Cette propriété est à la source étymologique du terme *herpès*, dérivé du grec « *herpein* », qui signifie « accroché de façon permanente ». Cette latence est fréquemment entrecoupée par des périodes de réactivation (entrées dans le cycle lytique), qui permettent la production de nouvelles particules virales (Farell, 2015).

Les virus de l'herpès forment l'ordre des *Herpesvirales*. Les herpès virus strictement humains sont au nombre de huit, classés dans la famille des *Herpesviridae*, et répartis en trois sous-familles, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* et *Gammapherpesvirinae* (Figure 1.1) Cette classification est effectuée selon le tropisme cellulaire, la structure du génome, et la séquence nucléotidique. L'EBV appartient à la sous-famille des *Gammapherpesvirinae*, et au genre *Lymphocryptovirus*.

La sous-famille *Alphaherpesvirinae* comprend les virus *Herpès simplex* de types 1 et 2 (HSV1, HSV2) et le virus de la varicelle et du zona (VZV). Ces virus sont regroupés en raison de la variété des cellules qu'ils peuvent infecter, leur rapidité de propagation en culture cellulaire, leur efficacité à détruire les cellules qu'ils infectent (cycle lytique), et leur capacité à établir une latence, principalement dans les ganglions sensitifs (Roizman et Whitley, 2001).

La sous-famille *Betaherpesvirinae* regroupe les cytomégalovirus (CMV) et les herpès virus humains 6 et 7 (HHV6, HHV7). Ils sont caractérisés par le nombre restreint de cellules qu'ils peuvent infecter. Leur cycle réplcatif est plus long, et ils se propagent plus lentement en culture cellulaire. Ces virus, et particulièrement le CMV, entraînent typiquement un élargissement des cellules infectées (cytomégalie). Les sites de latence de ces virus sont les glandes salivaires, les cellules lymphoréticulaires, les cellules rénales, et d'autres tissus.

La sous-famille *Gammapherpesvirinae* comprend l'EBV et l'herpès virus humain 8 (Herpès virus associé au syndrome de Kaposi) (HHV8). Ils se distinguent par leur capacité à se répliquer *in vitro* dans les cellules lymphoblastiques, et certains peuvent causer une infection lytique dans les cellules de types épithélial et fibroblastique. Les virus de cette sous-famille infectent préférentiellement les lymphocytes B, et les sites de latence semblent se situer majoritairement dans les tissus lymphoïdes (Roizman et Whitley, 2001).

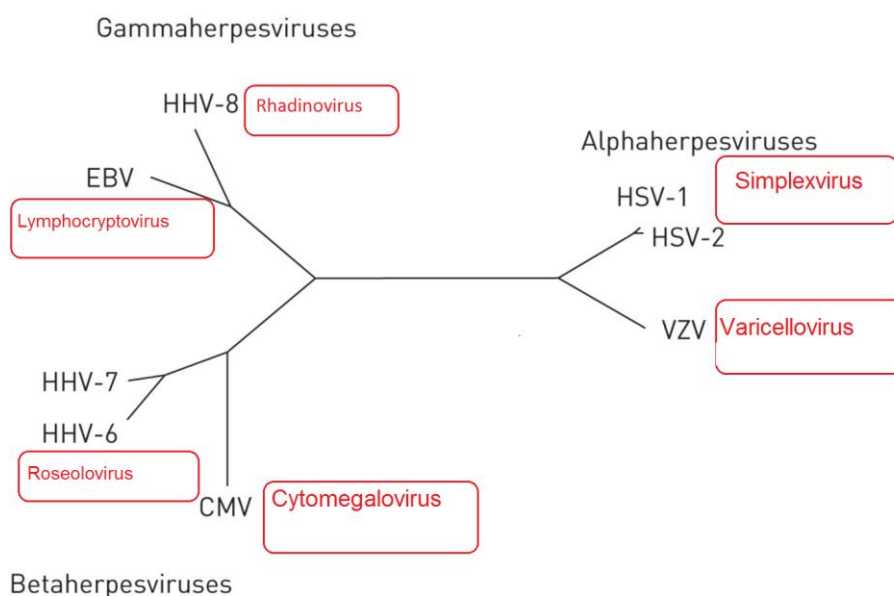


Figure 1.1 : Taxonomie des *Herpesviridae*, L'EBV appartient à la sous-famille des *Gammapheresevirinae*, et au genre *Lymphocryptovirus*. D'après (Arvin et al., 2007)

1.1.3. Structure du virion

L'EBV possède la structure commune à tous les herpès virus : il est composé d'une molécule d'ADN double brin linéaire enroulée autour de structures protéiques fibrillaires, appelées « core » (Young et Murray, 2003). Cet ADN est contenu dans une capside icosaédrique protéique mesurant de 100 à 110 nm de diamètre, et comprenant 162 capsomères. La capside est protégée par un complexe membranaire formé d'une couche fibreuse de phosphoprotéines, appelée le tégument, recouverte d'une enveloppe dérivant de la membrane cellulaire. Celle-ci contient plusieurs glycoprotéines (gp) de surface, nécessaires à l'infection (Figure 1.2). Le génome de l'EBV est maintenant censé coder des gènes pour 13 glycoprotéines, dont 12 sont exprimés uniquement pendant le cycle de réplication lytique productif et dont l'un peut être exprimé pendant la latence aussi (Hutt-Fletcher., 2015).

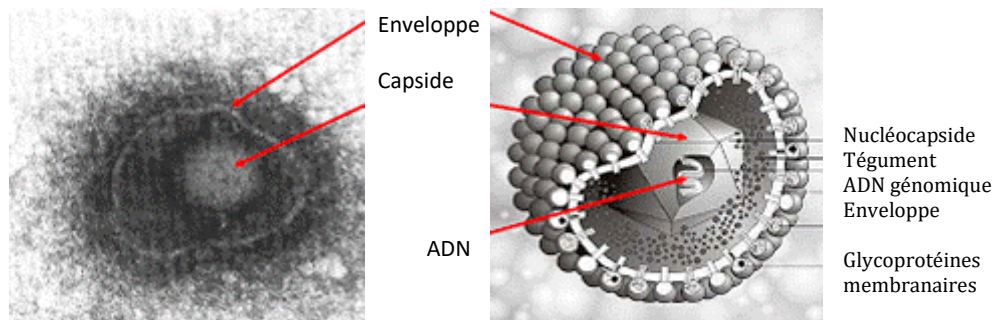


Figure 1.2 : Structure du virion d'EBV. A) photos par microscopie électronique. B) schéma représentatif (Thompson et Kurzrock., 2004).

1.1.4. Structure et organisation du génome viral

Le génome de l'EBV a été entièrement séquencé en 1984 à partir de la souche de référence B95-8 (lymphocytes B de marmousets infectés par l'EBV provenant de patients atteints de mononucléose infectieuse) (Baer et al., 1984). Le génome de l'EBV est constitué d'un double brin d'ADN long de plus de 172 000 paires de bases (pb), codant pour environ 100 protéines virales (Davison., 2007). Le génome comporte (Figure 1.3A) :

- Une série de séquences terminales répétées (TR ou *Terminal Repeat*) : plusieurs copies inversées (répétées 1 à 5 fois) d'une séquence de 500 pb à chaque extrémité du génome, qui rendent possible la circularisation de l'ADN sous forme d'épisome ;
- Quatre séquences de répétitions internes (IR ou *Internal Repeat*) d'environ 3 kb (IR1 à IR4), divisant le génome en deux régions uniques : une région courte (US) comprenant la région U1 et une région longue (UL) comprenant les régions U2, U3, U4 et U5 ;

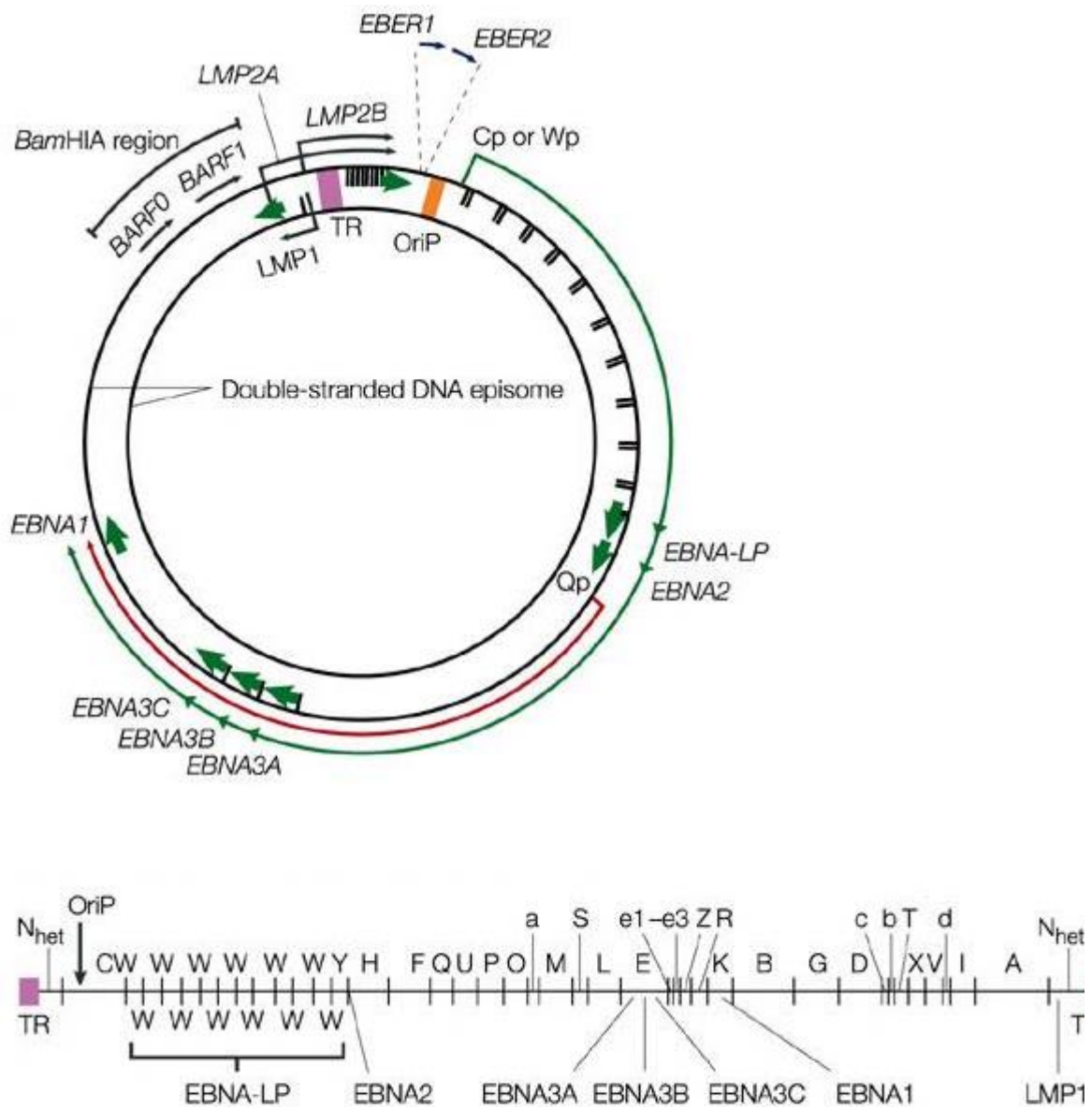


Figure 1.3 : Schéma représentatif de l'organisation du génome de l'EBV A) Organisation des gènes latents dans l'épisome de l'EBV. (*OriP*) représente l'origine de la réplication de l'épisome. Les régions codantes des protéines de latences (EBNA-1, 2, 3A, 3B, 3C EBNA-LP et LMP-1, 2A, 2B) sont représentées par les flèches verts et leurs direction représentent la direction de la transcription. Les EBER-1, 2 sont représentés par les petites flèches bleues. La flèche verte, à l'extérieur, représente les transcriptions de la latence III. La flèche rouge, plus courte, à l'intérieur, représente la transcription de EBNA-1 à partir du promoteur Qp pendant la latence I et II. B) la carte de restriction BamH1 du génome linéaire et l'organisation du cadre de lecture ouvert des protéines de latence d'EBV (Young et Rickinson., 2004).

- Deux séquences identiques de 1 kb, localisées à deux endroits différents du génome viral, l'une au contact d'IR2 (séquence DL) et l'autre au contact d'IR4 (séquence DR). Elles contiennent respectivement les origines de réplication lytique (oriLyt) et latente (oriP).

Lors de l'infection de la cellule hôte, le génome de l'EBV se circularise grâce aux séquences terminales TR par un mécanisme encore inconnu (Figure 1.3B). L'ADN viral forme alors un épisome ou CCC (Covalently Closed Circle), qui lui permet de se lier étroitement à la chromatine cellulaire ; sous cette forme, l'EBV peut se maintenir dans la cellule hôte sans s'intégrer au génome de celle-ci.

Une centaine de cadres de lecture ouverts ou ORF (*Open Reading Frame*) ont été identifiés suite à l'analyse de la séquence génomique de la souche de référence B95-8. Ils sont désignés en fonction de la nomenclature des fragments obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *BamH1*. Ces fragments, au nombre de 26, ont été classés de A à Z et de a à h en fonction de leur taille décroissante (Ooka, 1985). Les séquences analysées sont ainsi répertoriées selon le fragment de restriction BamH1 auquel elles appartiennent, le sens de transcription (L pour *Leftward*, vers la gauche et R pour *Rightward*, vers la droite) et enfin leur ordre dans le sens de transcription de ce fragment. Par exemple, le gène *BARF1* (BamH1 A Right Frame 1) correspond au premier cadre de lecture situé dans le fragment BamH1 A et est transcrit de gauche à droite (Ooka, 1985).

1.1.5. Polymorphisme du virus Epstein-Barr

Le séquençage des génomes viraux de plusieurs souches d'EBV montre qu'il existe plusieurs variations génétiques au sein des régions uniques. Ces variations ont permis de classer les souches virales en deux types, type A et type B, ou EBV 1 et EBV 2 (Miller et Lipman, 1973 ; Pizzo et al., 1978). Ce polymorphisme réside dans des variations de séquences au niveau des gènes de latence encodant la famille EBNA (*EBV Nuclear Antigens*) qui regroupe : EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B et EBNA-3C, la divergence en acides aminés entre les deux isolats pour ces protéines est respectivement de 47 %, 16 %, 20 % et 28 % (Sample et al., 1986).

La répartition géographique des isolats A et B dans la population mondiale n'est pas homogène. Le type A est majoritairement prévalant en Occident (80 à 95 % de la population mondiale, notamment en Europe et en Amérique), alors que le type B est plus fréquent en Afrique équatoriale et en Nouvelle Guinée (jusqu'à 24 % dans les zones où le lymphome de Burkitt est endémique, comme le Kenya).

Au niveau fonctionnel, il existe des différences biologiques entre les deux types viraux. En effet, les souches de types A possèdent un pouvoir transformant plus important. La croissance des lignées lymphoblastoïdes établies *in vitro* à partir de souches de type B semble plus lente comparativement à celles des lignées établies à partir de souches de type A (Rickinson et al., 1987 ; Tzellos et Farrell, 2012).

Les caractéristiques épidémiologiques et géographiques très particulières du NPC ont conduit à la découverte de l'existence d'un type de souche supplémentaire de l'EBV, appelé type C, et responsable du NPC. Le type C est dépourvu de site BamH1 entre les régions BamH1 W et I (Lung et al., 1991).

De plus, il existe d'autres polymorphismes au sein des souches de type A et B, notamment au niveau des régions répétées du génome viral, ce qui explique l'existence de nombreux isolats différents. Les polymorphismes au niveau de plusieurs gènes dont *BNLF1*, codant pour la protéine de latence membranaire (LMP-1), provoquent des différences structurales et fonctionnelles de cette protéine (Hu et al., 1991 ; Hadhri-Guiga et al., 2006 ; da Costa et al., 2015). Les variations au niveau du gène *BNLF1* incluent :

- Des substitutions de plusieurs bases dans la région du promoteur et de la séquence codante ;
- Des délétions de 30 pb, 15 pb et de 69pb (del-LMP-1), et l'insertion de répétitions de 33 pb dans le domaine C-terminal (fréquemment observées dans les CGaEBV) ;
- La perte du site de restriction XhoI (*XhoI-loss*), résultant de la mutation d'un G en T en position 169 425.

1.1.6. Les voies de transmission

L'EBV infecte plus de 90 % de la population adulte. La première infection survient en principe suite à un contact salivaire, souvent pendant l'enfance ou l'adolescence, d'où l'appellation « maladie du baiser » (Rickinson et Kieff., 2001). 100 % des enfants sont infectés avant l'âge de deux ans dans les pays en voie de développement, alors que dans les pays développés, l'infection peut survenir pendant l'adolescence ou à l'âge adulte (Rickinson et Kieff., 2007). La transmission peut également survenir par transfusion sanguine (Tattevin et al., 2002), par voies sexuelles, ou lors de la transplantation d'organes (Gratama et al., 1988). La présence de l'EBV a par ailleurs été détectée dans le lait maternel (Junker et al., 1991).

1.1.7. Tropisme cellulaire

In vivo, la primo-infection survient le plus souvent après contact salivaire. Ce contact permet la diffusion du virus dans la sphère oropharyngée, pendant laquelle l'EBV infecte préférentiellement les lymphocytes B. Ces cellules activées prolifèrent de façon polyclonale et subissent une différenciation en lymphocytes B mémoires circulants, suite à l'expression des gènes latents du virus (Borza et al., 2002).

Après la primo-infection, le virus persiste dans l'organisme, ce qui implique la notion de cellules « réservoirs ». Il existe deux types de cellules réservoirs pour l'EBV : les lymphocytes B et les cellules épithéliales oropharyngées.

In vitro, l'EBV a la capacité unique de transformer les lymphocytes B naïfs ou quiescents en cellules lymphoblastoïdes infectées de façon latente et permanente ou LCL (*Latently infected Lymphoblastoid cell lines*). Cet outil est essentiel pour étudier les propriétés transformantes du virus. La transformation des lymphocytes B en LCL constitue le modèle idéal pour décrire l'infection par l'EBV (Young et Rickinson, 2004).

Dans certaines circonstances, l'EBV est capable d'infecter d'autres types cellulaires comme les lymphocytes T (Kanegane et al., 1998a ; Kanegane et al., 1999), les cellules NK (*natural killer cells*) (Kanegane et al., 1998b ; Isobe et al., 2004), et les monocytes (Guerreiro- Cacaïs et al., 2004). De plus, les maladies associées à l'EBV ont permis de décrire d'autres types cellulaires pouvant être infectés par l'EBV. En effet, le génome viral a été détecté dans les cellules tumorales du nasopharynx (NPC), dans les cellules tumorales gastriques (Burke et al., 1990), dans certains cas d'hépatocarcinomes (Li et al., 2004) et dans des carcinomes mammaires (Arbach et al., 2006).

1.2. Physiologie de l'infection par le Virus d'Epstein-Barr

1.2.1. Attachement et pénétration de l'EBV dans les cellules cibles

1.2.1.1. Infection des lymphocytes B

Cinq glycoprotéines virales ont été impliquées d'une certaine manière dans l'entrée efficace de l'EBV dans les cellules B (gp350/220, gp42, gH, gL et gB) (Sathiyamoorthy et al., 2016). La glycoprotéine gp350/220 est l'une des plus abondantes dans l'enveloppe virale. Elle est responsable de la fixation du virus à la cellule infectée, ayant une grande affinité pour le récepteur membranaire CD21, également connu sous le nom de récepteur du complément C3d (Fingerroth et al., 1984 ; Hutt-Fletcher et Lake, 2001). En partenariat avec CD21, la molécule du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II sert de corécepteur

pour l'EBV. Les autres glycoprotéines virales forment un complexe nécessaire à la fusion et à la pénétration du virus dans la cellule hôte (Figure 1.4) (Johannsen et al., 2004 ; Ogembo et al., 2013).

L'interaction décrite ici permet la fusion des membranes virales et de l'endosome, libérant la capside dans le cytoplasme de la cellule infectée. La décapsidation permet la libération du génome viral linéaire et son importation dans le noyau. À ce stade, le génome viral se circularise pour former un épisome. Cette circularisation nécessite la ligation directe ou la recombinaison de l'intégrité des TR (Cohon., 2006).

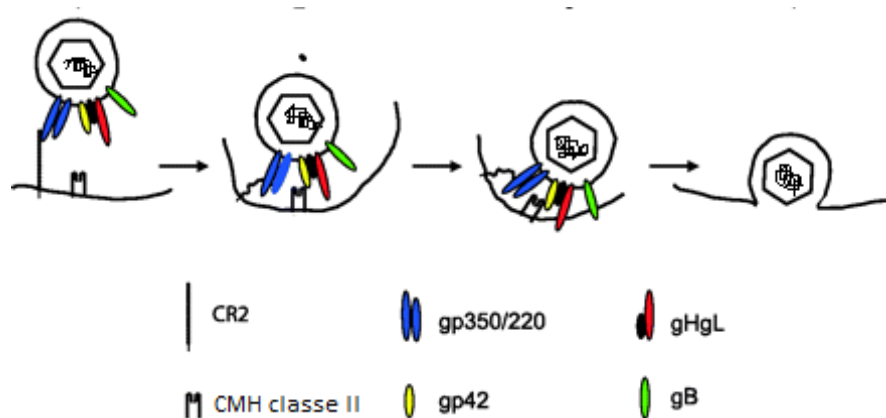


Figure 1.4: Mécanisme d'attachement et de fusion de l'EBV au lymphocyte B, d'après (Hutt-Fletcher et al., 2007).

1.2.1.2. Infection des cellules épithéliale

Alors que de nombreux modèles de systèmes de culture sont disponibles pour étudier la latence de l'EBV dans les cellules B, les modèles pour étudier le cycle de vie de l'EBV dans les cellules épithéliales *in vitro* font défaut. Les cellules épithéliales sont mal infectées *in vitro*, et les lignées cellulaires infectées par EBV n'ont pas été obtenues avec succès à partir de tumeurs épithéliales. Récemment, il a été démontré que les cultures organotypiques de kératinocytes oraux peuvent être utilisées comme modèle pour étudier l'infection par l'EBV dans le tissu épithélial. Ces cultures génèrent un tissu ressemblant à l'épithélium observé *in vivo* et présentent des niveaux élevés de réplication productive induite par la différenciation (Temple et al., 2017).

L'infection des cellules épithéliales par l'EBV est beaucoup plus complexe que celle des cellules B, car ni le récepteur CD21, ni la protéine HLA de classe II, ne sont présents sur la surface des cellules épithéliales (Imai et al., 1998 ; Fingerroth et al., 1999).

Selon Janz et al. (2000), des virus génétiquement modifiés n'exprimant pas les protéines gp350/220 peuvent infecter à la fois les lymphocytes B et les cellules épithéliales, ce qui semble indiquer que d'autres molécules du virus sont capables de faciliter l'entrée dans ces cellules. Cette hypothèse est renforcée par les résultats d'une récente étude portant sur un patient présentant une délétion génétique du CD21. L'étude a démontré que les cellules B provenant de ce patient sont facilement immortalisées avec l'EBV. Ceci suggère qu'un autre récepteur de fixation, différent du CD21, est présent à la surface des cellules B. Ce même récepteur pourrait être exprimé à la surface des cellules épithéliales (Thiel et al., 2012).

Le mécanisme par lequel les cellules épithéliales sont infectées a été le sujet de plusieurs investigations, et plusieurs mécanismes hypothétiques ont été décrits :

- (i) L'EBV infecte une cellule épithéliale par fusion avec une cellule B (Bayliss et Wolf, 1980).
- (ii) La surface d'une cellule épithéliale peut exprimer le récepteur CD21 dans certaines conditions. L'EBV peut alors infecter directement cette cellule (Birkenbach et al., 1992).
- (iii) L'infection par l'EBV est transférée à la cellule épithéliale depuis une cellule B ou une autre cellule épithéliale par contact cellule à cellule, sans fusion membranaire (Imai et al., 1998 ; Nanbo et al., 2016). Ce mécanisme semble être le mode dominant.

La compréhension des mécanismes moléculaires de pénétration dans les cellules épithéliales a fortement progressé dans les dix dernières années. Ainsi, on sait à présent que l'attachement de l'EBV aux cellules épithéliales indépendamment du récepteur CD21 peut être réalisé par trois mécanismes différents :

- (i) Les virions d'EBV entourés d'Immunoglobuline A (IgA) spécifique à la glycoprotéine virale gp350/gp220 peuvent se lier efficacement à un récepteur polymérique IgA (pIgR), qui se trouve dans la salive humaine. pIgR peut se fixer sur une protéine appelée SC (*secretory component*), protéine transmembranaire exprimée à la surface des cellules épithéliales. Le complexe EBV/IgA/SC est internalisé par endocytose dans la cellule épithéliale, faisant ainsi entrer le virus. Ce mécanisme a été proposé pour l'infection de l'épithélium oropharyngé (Lin et al., 1997).
- (ii) L'EBV utilise les intégrines de la cellule hôte pour se fixer. Les glycoprotéines virales gH-gL interagissent avec le complexe d'intégrines $\alpha\beta 6$ et $\alpha\beta 8$ des cellules épithéliales pour permettre l'attachement (Hutt-Fletcher, 2007 ; Chesnokova et Hutt-Fletcher, 2014).

(iii) La glycoprotéine de surface virale BMRF2 permet également l'interaction avec les intégrines $\beta 1$, $\alpha 5$, $\alpha 3$ et αV des cellules épithéliales, et ainsi l'attachement du virus à la cellule hôte (Tugizov et al., 2003).

La glycoprotéine gp42 empêche l'entrée de l'EBV dans les cellules épithéliales en interférant avec la liaison au complexe gH-gL. Il est intéressant de noter que les particules d'EBV libérées dans les cellules épithéliales sont riches en gp42, ce qui facilite l'infection subséquente de cellules B, mais pas de cellules épithéliales, alors que les particules libérées dans les cellules B ne contiennent pas de gp42, facilitant une infection ultérieure des cellules épithéliales, ainsi le tropisme cellulaire d'EBV dépend de la densité de gp42 à sa surface (Borza et al., 2002 ; Tsao et al., 2015).

Ce tropisme à double cellule suggère que l'EBV se transporte continuellement entre les cellules B et les cellules épithéliales au cours de son cycle d'infection, ce qui pourrait être crucial pour l'établissement d'une infection persistante chez l'homme.

Plusieurs arguments indiquent que l'infection des cellules épithéliales par l'EBV se fait principalement par le contact de cellule à cellule. Le taux d'infection par co-culture avec des cellules B EBV-positives est 10^3 fois plus élevé que par une infection directe (Figure 1.5) (Imai et al., 1998 ; Chang et al., 1999 ; Wu et al., 2007 ; Chesnokova et Hutt-Fletcher, 2014).

En outre, la plupart des virions de l'EBV sont retenus sur les surfaces cellulaires après la liaison aux cellules B primaires, et transférés aux cellules épithéliales, ce qui entraîne l'augmentation de l'efficacité de l'infection par rapport à l'infection virale directe (Shannon-Lowe et al., 2006 ; Shannon-Lowe et Rowe, 2011).

Toutes ces études soutiennent l'hypothèse que les cellules B infectées par l'EBV migrent dans le stroma épithélial ou l'espace intra-épithélial, et contribuent à une transmission virale efficace dans l'épithélium, et ce par contact cellule à cellule.

Les mécanismes moléculaires de la transmission de l'EBV par contact cellule à cellule ne sont pas complètement élucidés. Shannon-Lowe et al. (2006) ont montré que les virions d'EBV chargés à la surface des lymphocytes B primaires facilitent la formation d'une conjugaison intracellulaire semblable à la synapse virale (VS) entre les cellules B et les cellules épithéliales co-cultivées. La VS est une jonction adhésive étroite à travers laquelle le virus peut être efficacement transféré depuis les cellules infectées vers les cellules cibles, sans fusion des membranes cellulaires. Un rôle important pour la glycoprotéine virale BMRF2 a été proposé dans la pénétration de l'EBV par contact cellule à cellule dans les cellules épithéliales orales polarisées (Xiao et al., 2007 ; Xiao et al., 2008).

Une récente étude a démontré que l'EBV exploite la machinerie de l'endocytose de la cellule hôte et de la cellule réceptrice afin de faciliter le contact cellule à cellule, favorisant ainsi une transmission virale efficace. Ces résultats suggèrent que l'infection de différents types cellulaires par l'EBV utilise un grand nombre de voies, la plupart desquelles sont encore inconnues (Nanbo et al., 2016).

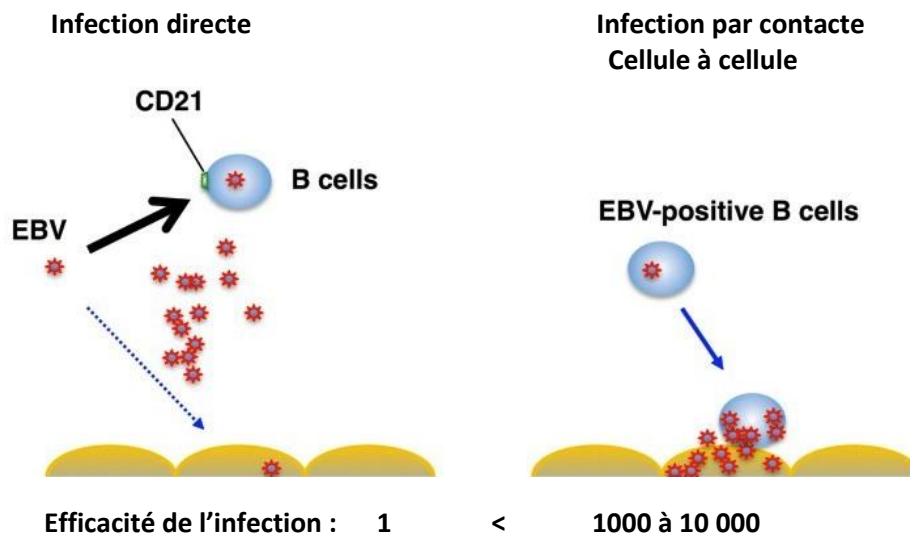


Figure 1.5 : Comparaison entre l'infection directe et infection par contact cellule-à-cellules (Lizasa et al., 2012).

1.2.2. Persistance du génome viral dans l'organisme

La persistance de l'EBV dans l'organisme après la primo-infection est le plus souvent sans conséquence pathologique apparente pour l'hôte infecté : on peut ainsi parler de la notion de porteurs sains potentiellement contaminants. Cette cohabitation pacifique est le résultat d'un équilibre complexe entre trois phénomènes (Young et al., 2016) :

- (i) L'interaction entre le virus et la cellule hôte se manifeste sous deux formes complémentaires : l'infection latente et l'infection lytique. L'infection latente se traduit par la persistance du génome viral dans la cellule et l'expression de plusieurs protéines de latence. L'infection lytique ou productive est caractérisée par la synthèse de particules virales (virions) et la destruction de la cellule hôte. Ces deux types d'infections sont possibles dans les lymphocytes B et probablement dans certaines cellules épithéliales.
- (ii) Les deux formes d'infection virale, latente et lytique, sont conditionnées par « la physiologie normale » de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B pour la

colonisation initiale d'une part, et la persistance du virus dans le tissu lymphoïde d'autre part, en particulier au niveau de l'oropharynx.

- (iii) La réponse immunitaire anti-EBV contrôle la quantité de virions libres et le nombre de cellules infectées dans l'organisme, ceci sans pouvoir éradiquer l'infection. Cependant, l'EBV a développé de nombreuses stratégies au cours de l'évolution qui lui permettent d'échapper à ce contrôle immunitaire.

Néanmoins, la persistance de l'EBV n'est pas toujours asymptomatique ; elle peut également aboutir à des cancers dits « associés à l'EBV », les cellules tumorales contenant alors le génome viral et exprimant certaines protéines de latence oncogéniques. Cette évolution cancéreuse est le résultat d'un déséquilibre entre les trois phénomènes cités plus haut. L'infection virale étant ubiquitaire dans la population générale, et le virus étant normalement lymphotrope et épithéliotrope, les critères de cette association sont complexes et encore discutés. Le rôle de l'EBV dans certains types de cancers a néanmoins été clairement démontré, comme dans le cas du lymphome de Burkitt, certains lymphomes de Hodgkin, et le carcinome indifférencié du nasopharynx (Tzellos et Farrell., 2012).

1.3. Infection latente et maintien du génome

Suite à la primo-infection, les lymphocytes B expriment un programme de latence dit de type III, et prolifèrent. Cette première phase d'infection virale induit une forte réponse immunitaire, essentiellement représentée par les lymphocytes T cytotoxiques (LCT) spécifiques des antigènes de latence III. Cette phase aboutit à la lyse de nombreuses cellules infectées. Cependant, certaines cellules échappent à cette réaction immunitaire suite à l'inhibition de l'expression de leurs gènes de latence (1 à 60 cellules pour 1 million de cellules lysées). Ces cellules constituent le réservoir de lymphocytes B mémoires, dans lesquelles aucune des protéines de latence n'est exprimée (latence virale de type 0). Ces lymphocytes B mémoires infectés gagnent alors la circulation périphérique.

Par ailleurs, dans les cellules épithéliales de l'oropharynx, le virus persiste de façon lytique (Thorley-Lawson et Gross, 2006 ; Rowe et al., 2011 ; Thorley-Lawson et al., 2013).

L'immortalisation des cellules B par l'EBV joue un rôle central dans le développement de nombreux lymphomes à cellules B, et est nécessaire pour la persistance de l'EBV chez les hôtes infectés. Les produits du génome de l'EBV exprimés au cours de la latence sont les suivants (Calderwood et al., 2007 ; Hutzinger et al., 2009) :

- Les protéines nucléaires EBNA (*Epstein-Barr Nuclear Antigen*) : elles sont au nombre de six : EBNA- 1, -2, -3A, -3B, -3C et -LP.
- Les protéines de latence membranaire LMP (*Latent Membrane Protein*) : elles sont au nombre de trois : LMP-1, -2A, et -2B.
- Les ARN nucléaires non poly-adénylés EBER (*EBV Encoded RNA*) : ils sont au nombre de deux : EBER-1 et EBER-2.
- Les microARN (miARN) : ils sont issus de deux régions principales du génome. La première est proche du gène BHRF1 (*BamHI fragment H Rightward Transcript*), la deuxième est localisée dans la région BART (*BamHI A region's Rightward Transcripts*). Les miARN sont généralement nommés BART.

L'expression des protéines de latence contribue aux propriétés d'immortalisation et/ou de transformation de l'EBV en influençant la machinerie cellulaire, afin de contrôler la croissance et la survie des cellules infectées. Il existe différents types de latence virale selon le contexte de l'infection cellulaire, et selon la nature des gènes exprimés par l'EBV. Au moins quatre programmes d'expression génique différents ont été décrits, nommés latence 0, I, II et III (Rowe et al., 1992 ; Rickinson et Kieff, 2001 ; Ali et al., 2015).

Les différents programmes d'expression génique correspondent à une utilisation alternative des sites d'initiation de la transcription et des éléments promoteurs. Ainsi, trois promoteurs de latence virale sont décrits : Wp, Cp et Qp. En effet, l'expression des protéines de latence dépend du type de tissu (ou de tumeur) à partir duquel la lignée cellulaire EBV-positive a été dérivée (Babcock et al., 2000). Il faut noter que les ARN EBER-1 et EBER-2 s'expriment dans chacune des latences, et les miARN BART sont exprimés au moins en partie lors des latences I, II et III. Aucune donnée n'existe sur leur statut durant la latence 0 (Tempera et Lieberman, 2014).

a. Latence de type I : elle est observée dans le lymphome de Burkitt BL, certaines lignées issues de BL. Elle se caractérise par l'expression d'EBNA-1, des EBER-1 et -2, ainsi que des BART (Tsao et al., 2015).

b. Latence de type II : elle est observée dans la maladie de Hodgkin, les lymphomes à cellules T/NK, le NPC, et le CG ?. Elles se caractérise par l'expression des protéines de latences EBNA-1, LMP-1, LMP-2A et/ou LMP-2B, des EBER, et des BART (Tsang et al., 2010 ; Tsao et al., 2012).

c. Latence de type III : elle est observée dans les cellules B transformées *in vitro* par l'EBV (LCL), dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés (sujets atteints du

1.3.1. Les produits des gènes de latence

L'utilisation d'un EBV recombinant dépourvu de gènes latents individuels a démontré le rôle indispensable des protéines EBNA-2 et LMP-1 dans la transformation *in vitro* de cellules B, et a mis en évidence un rôle critique pour EBNA-LP, EBNA-3A et EBNA-3C dans ce procédé (Kieff et Rickinson, 2001).

1.3.1.1. Les protéines nucléaires EBNA

L'expression des gènes codant pour les protéines EBNA est sous le contrôle de 3 promoteurs : Cp, Qp, et Wp. Au début de l'infection par l'EBV, le promoteur Wp initie l'expression de ces gènes, puis, lorsque la transformation cellulaire est établie, le promoteur Cp prend le relais (latence III). Le promoteur Qp, quant à lui, est utilisé dans les phases de latence I et II.

1.3.1.1.1. EBNA-1

EBNA-1 est une phosphoprotéine nucléaire formée de 641 acides aminés, de poids moléculaire variant entre 69 et 96 KDa (Baer et al., 1984). Elle est exprimée dans toutes les cellules infectées par l'EBV à l'exception des lymphocytes B mémoires (Babcock et al., 1999). EBNA-1 est indispensable à la persistance et à la réplication du génome épisomale viral, ainsi qu'à la transcription dans les cellules en division.

EBNA-1 est le seul antigène nucléaire de l'EBV exprimé à la fois pendant l'infection latente et l'infection lytique, et contribue à l'infection latente de multiples façons. EBNA-1 supprime la réactivation lytique spontanée dans le statut d'infection latente (Young et Murray, 2003). Cette protéine joue plusieurs rôles :

- Réplication du génome virale : La réplication est assurée par la liaison spécifique de la protéine EBNA-1 à l'origine de réplication du plasmide (*oriP*) et au chromosome de la cellule hôte (Kieff et Rickinson, 2001; Longnecker et al., 2013). L'interaction entre l'ADN cellulaire et EBNA-1-*(oriP)* conduit à une seule réplication du génome de l'EBV pendant la phase S, réplication suivie d'une ségrégation égale du génome viral répliqué dans les cellules filles. Ce mécanisme assure le maintien d'un nombre stable d'ADN viral dans les cellules filles (Longnecker et al., 2013).

- Activation de la transcription des gènes latents viraux et des gènes de l'hôte : La protéine EBNA-1 se lie aux éléments de l'ADN viral et aux promoteurs cellulaires (Canaan et al., 2009 ; Dresang et al., 2009). Elle active les promoteurs Cp et Wp, et inhibe les

promoteurs Qp (Hebner et al., 2003), ainsi que les promoteurs de LMP-1 et LMP-2A (Kieff et Richinson, 2001). Pour assurer cette fonction, EBNA-1 se lie à la nucléoline et à la nucléophosmine (NPM) (Liu et al., 2012 ; Malik-Soni et al., 2014). *In vitro*, EBNA-1 peut moduler la transcription de plus de 100 gènes dans les cellules BJAB infectées par l'EBV (Canaan et al., 2009). D'autre part, EBNA-1 est elle-même régulée via la phosphorylation de ses sérines, et peut ainsi à la fois transactiver et maintenir le génome viral (Kitamura et al., 2006).

- Oncogenèse : La protéine EBNA-1 peut également contribuer à l'oncogenèse. En effet, il a été démontré que l'expression d'EBNA-1 dans les lymphocytes B de souris transgéniques résulte en l'apparition de lymphomes de cellule B. Ceci suggère un rôle direct pour EBNA-1 dans l'oncogenèse (Wilson et al., 1996).

Des études antérieures ont montré que la protéine EBNA-1 joue un rôle important dans l'immortalisation cellulaire. Cette protéine est détectable dans toutes les cellules immortalisées par l'EBV *in vitro*, ainsi que dans toutes les cellules tumorales liées à l'EBV (Cohen et al., 2006).

Dans le NPC et le CG, EBNA-1 induit la synthèse de PML (*Promyelocytic leukemia protein*), protéine suppresseur de tumeur, localisée au niveau du corps nucléaire, et intervenant dans plusieurs processus tels que la régulation du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN et l'activation de p53. Ainsi, la perte de PML diminue l'activation de p53 et l'apoptose en réponse aux lésions de l'ADN. Par conséquent, la survie des cellules exprimant EBNA-1 et hébergeant des lésions de l'ADN peut améliorer l'instabilité génétique des cellules épithéliales infectées par l'EBV, et favoriser l'oncogenèse (Sivachandran et al., 2008 ; Cao et al., 2012 ; Sivachandran et al., 2012).

EBNA-1 peut également contribuer à l'oncogenèse en modulant diverses voies de signalisation, comme l'inhibition de la signalisation induite par TGF- β 1 (Wood et al., 2007 ; Flavell et al., 2008), ou l'augmentation de l'accumulation nucléaire du complexe NF- κ B p50-p50-bcl3, qui inhibe la phosphorylation de certaines protéines (Chung et al., 2013). La voie de signalisation NF- κ B est importante dans la modulation du microenvironnement des cellules tumorales du NPC et leur survie (Tsao et al., 2015).

1.3.1.1.2. EBNA-2

La protéine ENBA-2 est une phosphoprotéine nucléaire qui fait partie des premières protéines produites lors de l'infection par l'EBV (Alfieri et al., 1991). Elle intervient dans le

processus d'immortalisation des lymphocytes B infectés. Il a été montré que des particules virales issues d'une lignée P3HR-1, portant une délétion du gène codant pour EBNA-2 et des deux derniers exons d'EBNA-LP, sont incapables de transformer des cellules B *in vitro* (Rabson et al., 1982 ; Murray et al., 1988). La restauration du gène codant EBNA-2 dans la lignée P3HR-1 par recombinaison homologue a confirmé l'importance de cette protéine dans la transformation des cellules B, et a permis d'identifier les domaines fonctionnellement pertinents de la protéine EBNA-2 (Hammerschmidt et Sugden, 1989 ; Cohen, 1989).

EBNA-2 est responsable de la transactivation des gènes viraux et cellulaires, puisqu'elle stimule l'expression des EBNA (la majorité des promoteurs Cp) (Laux et al., 1994 ; Kieff, 1996) et des LMP (Kieff et Rickinson, 2001 ; Peng et al., 2005).

EBNA-2 active également la transcription d'un grand nombre de promoteurs dans le génome de l'hôte, comme le gène codant pour le récepteur de l'EBV CD21, ou les marqueurs d'activation des lymphocytes B (CD23 et CD40) (Pokrovskaja et al., 2002 ; Nikitin et al., 2010 ; Kempkes et Robertson, 2015).

EBNA-2 active également la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose comme A20, Bcl2, Mcl-1, et de gènes impliqués dans plusieurs processus de régulation cellulaires tels que NF- κ B. Elle peut également moduler les voies de signalisation associées aux facteurs de croissance (Elgueta et al., 2010 ; Ando et al., 2013).

Une récente étude a montré que la protéine EBNA-2 active d'une part la transcription de l'oncogène *MYC*, stimulant la prolifération cellulaire, et inhibe d'autre part la transcription du gène codant pour la protéine pro-apoptotique BCL2-L11, et inhibe donc l'apoptose (Wood et al., 2016).

Le mécanisme par lequel EBNA-2 agit comme un facteur de transcription a été étudié en détail. EBNA-2 contient un domaine d'activation de la transcription qui ne se lie pas directement à l'ADN, mais à certaines protéines cellulaires intermédiaires qui assurent la liaison de l'ADN dans les régions promotrices. Parmi ces protéines, on retrouve RBP-J κ (CBF1) (Waltzer et al., 1994 ; Peng et al., 2004) et les facteurs de transcription cellulaires PU.1 et AP2. Ainsi, le promoteur du gène *LMP-2A* est clairement régulé par EBNA-2 via RBP-J κ (Sinclair et al., 1991 ; Zimmer-Strobl et al., 1993).

De même, PU.1 et AP2 sont importants pour la régulation du promoteur de *LMP-1* par EBNA-2 (Sjoblom et al., 1998 ; Jansson et al., 2007a ; Jansson et al., 2007b). EBNA-2 peut également interagir avec d'autres facteurs de transcription comme ATF2 (*Activating Transcription Factor 2*), ETS1, ZNF143 et RUNX1 (Spender et al., 2002 ; Maier, 2006 ;

Kang et Kieff, 2015). En outre, EBNA-2 peut modifier la structure de la chromatine par le recrutement du complexe de remodelage de l'ADN (SWI /SNF) (Wu et al., 1996 ; Lucchesi et al., 2008 ; Freedman et al., 2011 ; Tsao et al., 2015).

1.3.1.1.3. EBNA-LP

La protéine EBNA-LP est produite à partir d'un transcrit dont l'extrémité 3' est commune avec le transcrit d'EBNA-2. Les protéines EBNA-LP et EBNA-2 sont synthétisées simultanément lors de l'infection par l'EBV (Alfieri et al., 1991). L'analyse génétique moléculaire indique que EBNA-LP n'est pas indispensable pour la transformation des lymphocytes B *in vitro*, mais intervient dans la croissance des LCL (Allan et al., 1992).

Le rôle majeur d'EBNA-LP est de potentialiser l'effet d'EBNA-2 dans la régulation de la transcription de certains gènes viraux et cellulaires (Peng et al., 2005 ; Portal et al., 2011), tels que le gène codant pour LMP-1 (Peng et al., 2000). En effet, EBNA-LP s'associe avec de multiples complexes formés de facteurs de transcription tels que HA95, Hsp70/72, Sp100, Hpl α , RBPJ et d'autres facteurs. Ces complexes se lient à EBNA-2 sur ou après les sites promoteurs, et conduisent à une activation efficace de la transcription (Portal et al., 2006 ; Portal et al., 2011 ; Portal et al., 2013).

En coopération avec EBNA-2, EBNA-LP active la cycline D2, protéine qui contrôle le passage de la phase G0 à G1 et l'entrée dans le cycle cellulaire des lymphocytes B quiescents. Une récente étude a déterminé que les deux protéines EBNA-LP et EBNA-2 s'associent avec des facteurs de transcription et des facteurs de liaison attachés à des éléments d'ADN en amont de *MYC*, ainsi qu'au niveau de gènes régulés par *MYC*. Ces associations forment une boucle d'ADN de longue distance, qui favorise l'entrée dans le cycle cellulaire, induisant une prolifération (Zhao et al., 2011 ; Portal et al., 2013). Des interactions *in vitro* ont été démontrées dans le noyau des cellules B entre EBNA-LP et Rb, p107 ou p53, mais aucun effet sur la cellule n'a été observé (Inman et Farrell, 1995).

1.3.1.1.4. La famille EBNA-3

La famille EBNA-3 est composée de trois protéines nucléaires de hauts poids moléculaire, codées par trois gènes localisés en tandem sur le génome de l'EBV : *EBNA-3A*, *EBNA-3C* et *EBNA-3B*. Les protéines de cette famille sont à l'origine du polymorphisme entre les souches EBV1 et EBV2 (Rowe et al., 1989 ; Sample et al., 1990).

Il a été démontré que si EBNA-3A et EBNA-3C sont indispensables pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*, EBNA-3B ne l'est pas (Tomkinson et al., 1993), mais semble jouer un rôle dans la suppression de la formation de tumeurs *in vivo*, puisque sa perte accélère le développement du lymphome (Tomkinson et Kieff, 1993 ; White et al., 2012).

Les protéines de la famille EBNA-3 activent et répriment individuellement ou coopérativement l'expression des gènes cellulaires (Hertle et al., 2009 ; White et al., 2010 ; McClellan et al., 2012). Tout comme EBNA-2, les protéines de la famille EBNA-3 ne se lient pas directement à l'ADN, mais interagissent via des protéines cellulaires capables de se fixer à l'ADN comme RBP-J κ et PU.1. Ainsi, elles peuvent moduler l'effet de transactivation d'EBNA-2, généralement de façon négative (Waltzer et al., 1996). Dans ce contexte, elles ont une action sur LMP-1 (Le Roux et al., 1994).

EBNA-3A et d'EBNA-3C travaillent en coopération pour moduler négativement les gènes suppresseurs de tumeur. Ainsi, de manière opérationnelle, elles sont considérées comme des oncoprotéines. Par contre, EBNA-3B est considéré comme un gène suppresseur de tumeur (Allday et al., 2015).

Parmi les gènes cible des protéines de la famille EBNA-3, on retrouve les gènes codant pour l'inhibiteur de kinase p16INK4a (Maruo et al., 2011 ; Maruo et al., 2013) et la protéine de liaison à la famille Bcl-2 pro-apoptotique BCL2L11 (Anderton et al., 2008 ; Skalska et al., 2010). EBNA-3C interagit avec MYC grâce au recrutement de son co-activateur SKp2, augmentant ainsi la transcription des gènes cibles pour MYC (Bajaj et al., 2008).

Les protéines de la famille EBNA-3, en particulier EBNA-3A et EBNA-3C, dérégulent un certain nombre de voies cellulaires comprenant le cycle cellulaire, l'apoptose et les métastases, ceci en grande partie grâce à des interactions protéine-protéine directes (Essmann et Schulze-Osthoff, 2012 ; Saha et Robertson, 2013 ; Saha et al., 2013).

EBNA-3C, en particulier, régule un réseau de protéines cellulaires en manipulant la machinerie protéasomique dirigée contre l'ubiquitine. En outre, EBNA-3A et EBNA-3C influencent la transcription des gènes en recrutant plusieurs facteurs de remodelage de la chromatine. Ces protéines jouent un rôle majeur dans la lymphomagenèse des cellules B induite par l'EBV, et pourraient donc faciliter le développement de thérapies ciblées dans un avenir proche (Bhattacharjee et al., 2016).

1.3.1.2. Les protéines de latence membranaire LMPs

1.3.1.2.1. LMP-1

a. Structure, synthèse et localisation subcellulaire

LMP-1 est une protéine membranaire de 69 kDa, formée de 386 acides aminés. Elle possède une homologie de structure avec la famille des récepteurs TNF (*Tumor Necrosis Factor*) (Mosialos et al., 1995). Sa structure peut être divisée en trois parties :

- Un domaine N terminal (NT) cytosolique formé de 24 acides aminés, riche en arginine et proline. Son rôle est l'orientation et l'ancrage de LMP-1 à la membrane, ainsi que son agrégation constitutive, assurant son pouvoir transformant.
- Un domaine transmembranaire formé de 6 domaines (TM1-6) de 162 acides aminés, impliqués dans la localisation de LMP-1 sur la membrane, et favorisant son agrégation et sa signalisation. Les domaines NT et TM ne sont pas directement responsables de la signalisation, mais ils sont indispensables aux propriétés transformantes de LMP-1 (Coffin et al., 2001).
- Un domaine C terminal (CT) cytosolique formé de 200 acides aminés, impliqué dans l'activation des voies de signalisation induites par LMP-1 grâce à deux régions importantes : TES1/CTAR1 et TES2/CTAR2 (*Transformation Effector Site/Carboxyl-Terminal Activating Region*). Entre ces deux régions, on retrouve la région CTAR3.

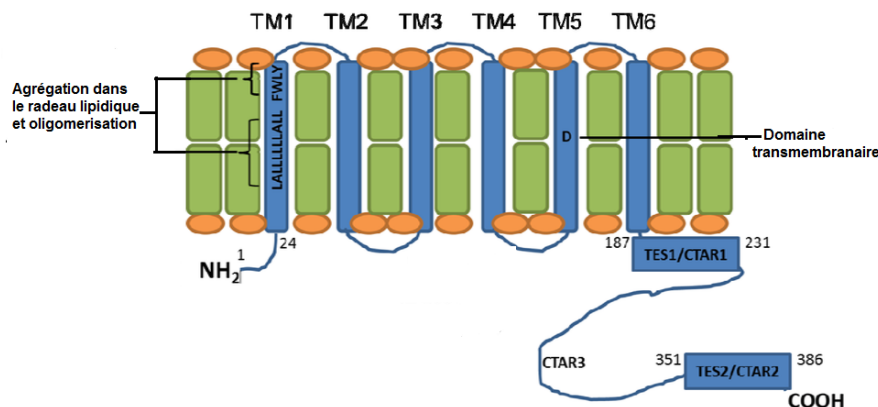


Figure 1.7 : Structure de LMP-1, d'après (Coffin et al., 2001).

Au niveau cellulaire, il est important de noter que LMP-1 est localisée aussi bien dans la membrane plasmique que dans les différentes membranes internes (Wang et al., 1988). Elle a également été localisée dans le microenvironnement tumoral, ainsi que dans la salive et le sérum sanguin de patients atteint de NPC, et cela dans des structures appelées exosomes

(petites vésicules sécrétées contenant des protéines, des ARNm et des microARN) (Flanagan et al., 2003; Houali et al., 2007). Suite à son transfert intercellulaire dans ces exosomes, LMP-1 pourrait moduler le microenvironnement tumoral et agir sur la croissance des lymphocytes avoisinants (Flanagan et al., 2003 ; Meckes et al., 2010).

La transcription du gène codant pour LMP-1 subit plusieurs voies de régulation : EBNA-2 et EBNA-LP jouent un rôle important dans la transactivation de son promoteur par l'intermédiaire de PBP- κ et PU.1 (Kempkes et Ling, 2015). D'autre part, EBNA-3A et EBNA-3C régulent négativement la transcription de LMP-1 (Lin et al., 2002). De plus, la présence de certains éléments cis dans la séquence promoteur agit sur la transactivation de LMP-1. Parmi ces éléments, on peut citer ATF/CRE (*Activating Transcription Factor/Cyclin AMP Response element*) et ISRE (*Interferon Stimulated Response Element*) (Sjöblom et al., 1998). Enfin, il a également été démontré que LMP-1 peut réguler elle-même son promoteur par l'activation des voies JNK et NF- κ B (Cao et al., 2014).

Plusieurs études ont décrit une forme lytique de LMP-1, appelée LMP-1-lytique ou LyLMP-1. C'est une forme tronquée de LMP-1, qui correspond à une délétion totale de NT et de TM1-4. LyLMP-1 est retrouvée pendant les premières phases de l'infection par l'EBV, et lors de la réactivation virale, pendant laquelle elle a un effet inhibiteur sur LMP-1. Elle inhibe notamment la voie de signalisation NF- κ B activée par LMP-1, et diminue ses propriétés transformantes et sa demi vie (Pandya et Walling, 2004 ; Pandya et Walling, 2006).

b. Voies de signalisations

LMP-1 est fonctionnellement apparentée aux membres de la famille des récepteurs de facteur de nécrose tumorale TNF dont la TNF1 (TNFR1, CD40 et IL1-R). Les deux régions TES1/CTAR1 et TES2/CTAR2 permettent la fixation de plusieurs adaptateurs cellulaires associés à TNF, et activent ainsi différentes voies de signalisations, qui relaient le signal initié par LMP-1 (Figure 1.8).

Le domaine TES1/CTAR1 relie TRAF1-2-3 et 5 (*TNF Receptor Associated Factors R*) et active les voies de signalisation NF- κ B (*nuclear factor- κ B*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) JNK (*c-Jun-N-terminal Kinase*), P38, ERK, et la voie PI3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*). Les gènes cibles de ces différentes voies de signalisations sont impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire, et influencent l'apoptose, l'oncogenèse et l'inflammation (Grimm et al., 2005 ; Mainou et al., 2005 ; Dawson et al., 2012 ; Kang et Kieff, 2015).

Ainsi, la délétion de CTAR1 ne permet plus les changements phénotypiques et l'immortalisation des cellules B infectées par l'EBV (Izumi et al., 1997 ; Izumi et kieff., 1997). Le domaine CTAR1, mais pas le domaine CTAR2, est également suffisant pour la transformation des fibroblastes de rongeurs, et possède la capacité unique d'activer PI3K, qui est requise pour ce phénomène.

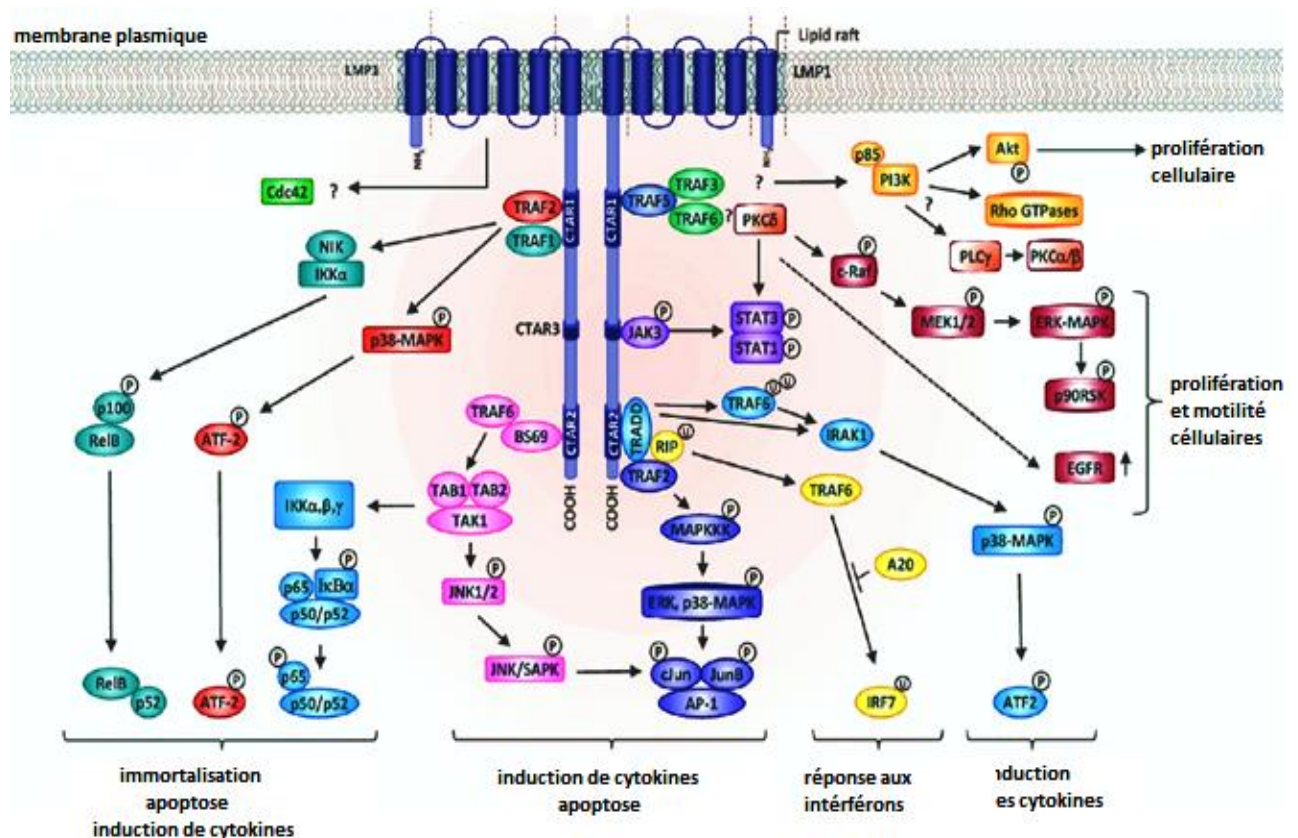


Figure 1.8 : Activation des voies de signalisation cellulaire par LMP1. La terminaison carboxyle de LMP1 contient trois domaines de signalisation : CTAR1, CTAR2 et CTAR3, qui recrutent des protéines adaptatrices de signalisation associées au TRNF (TRAF, TRADD, RIP), BS69 et des protéines Janus kinase (JAK) -3. Ceux-ci activent les voies de signalisation NF-κB, JNK / SAPK, PI3-K/Akt, ERK-MAPK, PLC/PKC et JAK/STAT qui induisent collectivement l'expression de nombreux effecteurs en aval qui ont un impact sur une variété de processus cellulaires tels que la prolifération, la survie, la motilité et l'invasion (Dawson et al., 2012).

d'une façon indirecte TRAF6, et est impliqué dans l'activation des voies de signalisations NF-κB, MAPK et IRF7 (*interferon-regulatory factor 7*). L'interaction à TRAF6 active la voie JNK (Wan et al., 2006 ; Ersing et al., 2013). Les voies de signalisation induites par le domaine CTAR2 sont essentielles aux premières phases de la transformation des cellules B.

La délétion de CTAR2 empêche la croissance à long terme des cellules B (Kaye et al., 1999 ; Eliopoulos et Young, 2001 ; Kang et Kieff, 2015).

La région CTAR3, située entre CTAR1 et CTAR2, est moins bien caractérisée. Elle ne fixe pas les molécules TRAF mais semble requise pour l'activation de la voie JAK3 (*Janus Kinase 3*), et active la voie JAK/STAT (Gireset al., 1999). La délétion de cette région ne semble pas perturber la liaison à JAK3 dans les LCL (Izumi et al., 1999 ; Mainou et al., 2005). L'ensemble des voies de signalisation détournées par LMP-1 induisent la régulation de nombreux gènes cellulaires impliqués dans plusieurs mécanismes comme la prolifération, la survie, la différenciation, l'adhésion et la motilité cellulaire.

c. Les fonctions de LMP-1

La protéine LMP1 a été identifiée comme l'oncogène majeur d'EBV. Ses propriétés sont la conséquence du détournement constitutif de voies de signalisation cellulaires provoquant l'immortalisation et la transformation de plusieurs types cellulaires. Cependant, LMP1 a plusieurs rôles au-delà de la transformation cellulaire et de l'immortalisation, allant de l'induction des cytokines et des chimiokines, de la modulation immunitaire, de l'altération globale des modèles d'expression des gènes et des microARN à la régulation de l'angiogenèse tumorale, de la migration cellulaire et de la croissance invasive de cellules tumorales.

- Régulation de la prolifération et la différenciation cellulaire

LMP1 se comporte comme un oncogène classique, transformant des fibroblastes de rongeurs in vitro et les rendant tumorigènes in vivo (Wang et al., 1985). La protéine LMP-1 exploite plusieurs voies de signalisation afin d'altérer la prolifération et la différenciation des cellules cibles. En effet, via l'activation de ces voies de signalisation LMP-1 entraîne la translocation nucléaire de plusieurs facteurs de transcription qui régule l'expression des facteurs contrôlant le déroulement du cycle cellulaire. Par exemple, LMP-1 active la voie PI3K/AKT et provoque l'export des facteurs de transcriptions Ets2, E2F4 et E2F5 qui régule négativement l'expression des protéines p16^{INK4a} et p21, en induisant ainsi la levée du blocage du cycle cellulaire (Ohtani et al., 2003 ; Mainou et al., 2007, Ben Nasr et al., 2009). En plus, LMP-1 peut stimuler la croissance cellulaire en régulant positivement l'expression des récepteurs des facteurs de croissance (par exemple EGFR, c-Met) (Miller et al., 1995 ; Lo et al., 2004).

Il a été démontré également que LMP-1 induit la transformation cellulaire via l'induction des protéines Id1 et Id3 (Inhibitor of differentiation 1 and 3), la transcription de ces dernières est régulée négativement par la TGF β médié par le facteur de transcription Smad. De ce fait, LMP-1 confère une résistance cellulaire vis-à-vis les effets induits par TGF β (Lo et al., 2010).

Plus important encore, la LMP1 intervient non seulement au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes mais aussi au niveau post-transcriptionnel, cette protéine peut induire une hyperméthylation du promoteur des gènes cellulaires par l'activation de l'ADN méthyltransférase 1 (DNMT1) soit par activation de la signalisation de JNK/AP-1 (Tsai et al., 2006), ou par l'activation de la voie RB-E2F (Seo et al., 2008) contribuant à la méthylation et à l'inactivation globales de multiples gènes dans les cellules tumorales épithéliales infectées par l'EBV (Tsai et al., 2006 ; Dutton et al., 2007).

D'autre part, LMP-1 provoque une instabilité génétique, des études ont montré que la réparation de l'ADN est inhibée dans les cellules exprimant LMP-1, ceci par une régulation négative de la kinase impliquée dans la détection des dommages de l'ADN, de l'ataxie télangiectasie mutée (ATM), de la réduction de la phosphorylation de ses cibles en aval Chk2 et de l'inactivation du point de contrôle G2 (Gruhne, et al., 2009).

- **Régulation de l'apoptose**

Pour améliorer la survie cellulaire, LMP-1 protégé les cellules infectées contre l'apoptose en induisant l'expression des protéines anti-apoptotiques (par exemple Bcl-2, Bfl-1, IAP et Mcl-1) (Henderson et al., 1991; Hong et al., 2000; Le Clorennec et al., 2006) ou inactivant l'expression des protéines pro-apoptotiques (par exemple Bad, Foxo3a et Par-4) (Lee et al., 2009(b) ; Dawson et al., 2012 ; Kempkes et Robertson., 2015), l'expression de ces protéines est sous le contrôle de la voie NF- κ B. Une récente étude a montré l'effet de LMP-1 à induire inhibition de l'apoptose cellulaire par l'activation de la transcription de la survivin à travers les voies de signalisation NF- κ B et PI3K / Akt (Sun et al., 2015). En revanche, les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet de LMP-1 sur l'apoptose ne sont pas connus précisément.

- **Altération du phénotype cellulaire**

L'activation des voies de signalisation cellulaire par LMP1 induit l'expression de marqueurs phénotypiques. LMP-1 active l'expression du CMH de classe I (Zhang et al., 1994) et elle induit aussi l'activation de plusieurs antigènes activateurs des lymphocytes B :

les CD21 (récepteur de l'élément C3d du complément), CD23 (récepteur de basse affinité des IgE), CD80 et CD83 (molécules de co-stimulation des lymphocytes B) (Dudziak et al., 2003), CD30 (membre de la famille du TNF-R1), CD39, CD40 et CD44. Elle active aussi des transporteurs d'antigènes TAP1 et TAP2 (*Transporter associated with Antigen Processing 1 and 2*), régulant l'immunogénicité des cellules infectées.

- Contribution dans le pouvoir métastatique

Des études révèlent que le LMP-1 a de multiples mécanismes pour favoriser les propriétés adhésives et migratoires des cellules épithéliales. LMP-1 régule la motilité cellulaire par la modulation des protéines de jonction, y compris la plakoglobine, l'intégrine- $\alpha 5$ et potentiellement par l'induction de la N-cadhérine via la voie MEK/ERK (Shair et al., 2008, Dawson et al., 2008 ; Wasil et Shair., 2015). En outre, LMP-1 provoque une hyperméthylation du promoteur du gène codant la E-cadhérine par l'activation de l'ADN transférase, ceci induit la suppression de l'expression de E-cadhérine et l'altération de l'adhésion intercellulaire (Tsai et al., 2002). Une récente étude démontre que LMP-1 module l'adhésion cellulaire par la régulation de la signalisation de l'activine A / TGF β et $\beta 1$ intégrine (Morris et al., 2016).

En plus, LMP1 est connu pour induire l'expression de métalloprotéinases matricielles in vitro, qui sont sécrétées par des cellules tumorales pour décomposer le stroma tissulaire environnant augmentant ainsi le potentiel invasif de cellules tumorales (Wang et al., 2002 ; Morris et al., 2008). Dans les cellules épithéliales (MDCK), LMP1 peut modifier profondément leur morphologie, induisant un phénomène connu sous le nom de transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT), c'est un phénomène qui peut être lié à la capacité de LMP1 à induire des propriétés cancéreuses (Kondo et al., 2011).

LMP-1 contribue également à l'angiogenèse en réduisant la dégradation du facteur inductible d'hypoxie-1 α (HIF-1 α) et en induisant l'expression du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) et MMP1 (Wakisaka et al., 2004 ; Kung et Raab-Traub., 2008; Kondo, et al., 2005). Récemment, il a été démontré que LMP-1 inhibe la voie LKB-AMPK pour altérer le métabolisme cellulaire (Lo et al., 2013), et via la voie NF- κ B, LMP1 peut moduler le microenvironnement de la tumeur et induit une inflammation favorisant le développement tumoral (Tsao et al., 2002 ; Dawson et al., 2012).

- Régule de la production des cytokines

LMP1 régule l'expression de plusieurs gènes codant pour des cytokines, ce sont des molécules solubles produites par les cellules du système immunitaire ou de différents tissus dont le rôle est le recrutement et l'activation des cellules immunitaires. En effet, LMP1 induit l'expression des cytokines CCL17 et CCL22 dans des cellules B infectées par l'EBV via l'activation des voies NF- κ B et p38/ATF2. La production de CCL17 et CCL22, qui attirent les lymphocytes T régulateurs, peut aider les cellules B infectées par l'EBV à échapper à la surveillance immunitaire (Nakayama et al., 2004).

LMP-1 contrôle également la transcription de différents gènes codant pour des chimiokines comme CCL3, CCL4, CCL5, CCL20, IP10, les chimiokines, sont des cytokines de petite taille (8 à 16 kDa) dont le rôle est d'attirer les lymphocytes T et les cellules NK qui vont éliminer les cellules infectées. (Vockerodt et al., 2005 ; Okudaira et al., 2006). D'autre part, LMP-1 induit l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires comme IL6, IL8, IL10, IL13, TNF α , TNF β et IFN γ afin d'assurer le maintien de l'état inflammatoire chronique favorable pour le développement tumoral (Sueur et al., 2014 ; Chang et al., 2017).

De plus, LMP-1 altère la réponse immunitaire contre l'EBV en induisant la production d'interféron. LMP-1 induit la production de l'IRF7 (Interferon Regulatory Factor7) qui est un facteur clé contrôlant toutes les réponses immunitaires dépendantes de l'interféron de type I (IFN- α/β), les taux élevés de l'IRF7 prive les cellules pour une seconde vague de production IFN plus diversifiée (Huye et al., 2007 ; Wang et al., 2017).

1.3.1.2.2. LMP-2

LMP-2 possède deux isoformes, LMP-2A et LMP-2B, codées par le même gène, mais par deux exons différents. Le gène s'étend à travers les répétitions terminales, de sorte qu'il n'est transcrit que lorsque l'EBV est sous forme circulaire (Laux et al., 1988). LMP-2A et LMP-2B partagent 12 domaines membranaires et un domaine cytosolique C-terminal de 27 acides aminés. Le promoteur de *LMP-2* est sensible à l'action d'EBNA-2, via ses sites d'interaction avec RBP-J κ et PU.1 (Figure 1.9) (Kieff et Rickinson, 2006).

LMP-2A possède une queue cytoplasmique N-terminale formée de 119 acides aminés. Cette séquence est tronquée chez LMP-2B. Ce domaine contient huit résidus tyrosine, dont Y74 et Y85, qui se présentent dans une séquence homologue au motif ITAM (*Immunoreceptor Tyrosin Based Activating Motif*), conférant ainsi à LMP-2A le pouvoir de fixer les protéines tyrosine kinases PTK (Cen et Longnecker, 2015).

Rappelons que le motif ITAM est présent dans le récepteur d'antigène des lymphocytes B BCR (*B-cell Receptor antigene complex*). Lorsqu'il est phosphorylé, suite à la fixation d'une immunoglobuline, il recrute et active les protéines tyrosine kinases Lyn et Syk de la famille Src. Celles-ci activent à leur tour la phospholipase C, qui augmente la mobilisation du calcium intracellulaire et active des voies de signalisation qui d'une part assurent la réactivation virale et le passage au cycle lytique, et d'autre part contrôlent la prolifération des cellules B (Dawson et al., 2012).

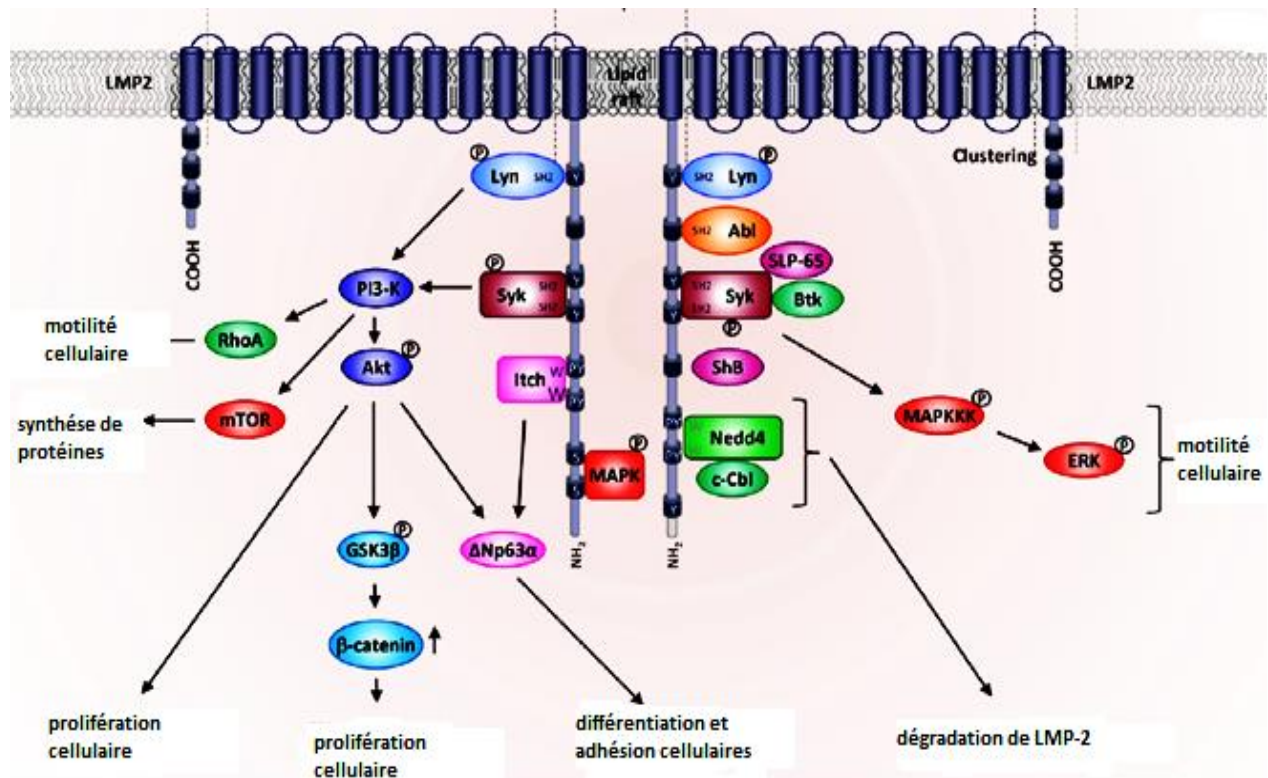


Figure 1.9: Activation des voies de signalisation cellulaire par LMP-2. L'extrémité amino-terminale de la LMP-2A contient des motifs qui fournissent des sites d'ancrage pour la tyrosine kinase Lyn, Syk et les ligues de la protéine Ned4. Ceux-ci activent les voies de signalisation PI3-K / Akt, JNK / SAPK, ERK-MAPK et Wnt / β -caténine, qui favorisent la croissance cellulaire, inhibent l'apoptose et la différenciation et contribuent à la transformation cellulaire (Dawson et al., 2012).

La protéine LMP-2A peut interagir avec Lyn et Syk via son motif ITAM phosphorylé, et ce indépendamment de l'activation par un antigène. Elle agit donc comme un inhibiteur négatif dominant et bloque ainsi la mobilisation du calcium et les voies de signalisation activées par BCR (Miller et al., 1994 ; Kang et Kieff, 2015), ce qui induit le blocage de la réactivation virale et du passage à la phase lytique. LMP-2A permet donc la persistance de

l'EBV en phase de latence dans les cellules B (Scholle et al., 1999 ; Rovedo et Longnecker, 2008).

De plus, la fraction de LMP-2A localisée dans les radeaux lipidiques bloque la translocation de BCR dans ces micro-domaines lipidiques, ainsi que l'internalisation du complexe BCR/antigène (Ikeda et Longnecker, 2007).

A l'extrémité N-terminale de LMP-2A, on retrouve deux motifs PY (PPXY), via lesquels LMP-2A s'associe spécifiquement aux ligands des protéines-ubiquitines de la famille Nedd4, ce qui a pour effet de réduire l'activité de LMP-2A, assurée par sa liaison aux PTK (Ikeda et Longnecker, 2007 ; Winberg et al., 2000). L'ubiquitination de LMP-2A régule négativement son rôle (Ikeda et al., 2003 ; Ikeda et al., 2004 ; Lv et al., 2017).

Des données récentes indiquent que le rôle de LMP-2A dans le maintien de la latence virale est complexe. LMP-2A augmente l'expression de Bcl-xL et active la voie Ras-PI3K-Akt, contribuant ainsi à la survie des cellules B. (Portis et Longnecker, 2004 ; Bultema et al., 2008). De plus, elle potentialise l'hyper-prolifération induite par MYC en régulant négativement p27 d'une manière dépendante du protéasome (Fish et al., 2014 ; Ok et al., 2015).

In vitro, LMP-2A joue plusieurs rôles dans les cellules épithéliales, grâce à l'activation de la voie PI3K-AKT et à la phosphorylation de GSK3. LMP-2A induit des changements phénotypiques remarquables, y compris la croissance indépendante d'ancrages dans la gélose, et favorise la signalisation de Wnt/ β -caténine dans les cellules épithéliales (Scholle et al., 2000 ; Morrison et Raab-Traub, 2005). Elle inhibe également la différenciation cellulaire et favorise la survie cellulaire par la stabilisation de la protéine p63, activée par la voie PI3K-Akt (Fotheringham et al., 2010 ; Kang et Kieff, 2015).

D'autres rôles ont été décrits pour LMP-2A, notamment la neutralisation des effets inhibiteurs de la croissance via l'action pro-apoptotiques de TGF- β 1 au cours de la carcinogenèse épithéliale, et la promotion de la prolifération et de la synthèse des protéines dans les cellules par l'activation de la voie PI3K/AKT/mTOR (Fukuda et Longnecker, 2004 ; Moody et al., 2005).

La protéine LMP-2A favorise l'invasion et la migration des cellules épithéliales, phénomènes qui peuvent être liés au phénotype métastatique (Lu et al., 2006(b)). De plus, il apparaît que LMP-2A active la voie NF- κ B-survivine pour assurer la survie et la progression des cellules épithéliales tumorales gastriques infectées par l'EBV (Hino et al., 2008).

La protéine LMP-2B, quant à elle, module les effets de LMP-2A *in vitro*, mais sa fonction *in vivo* reste largement inconnue (Rechsteiner et al., 2008).

1.3.1.3. Les ARNs viraux (EBERs et microARNs)

1.3.1.3.1. Les EBERs

a. Structure et localisation

Les ARN viraux EBER-1 et EBER-2 sont deux petits ARN non codants, formés de 166 et 172 nucléotides respectivement (**Figure 1.10**). Leurs séquences présentent 54% d'homologie croisée, et ils ne contiennent ni queue poly A à l'extrémité 3', ni coiffe sur l'extrémité 5'. Si EBER-1 est transcrit par les polymérases II et III, EBER-2 est uniquement transcrit par la polymérase II (Arrand et Rymo, 1982 ; Howe et Shu, 1989).

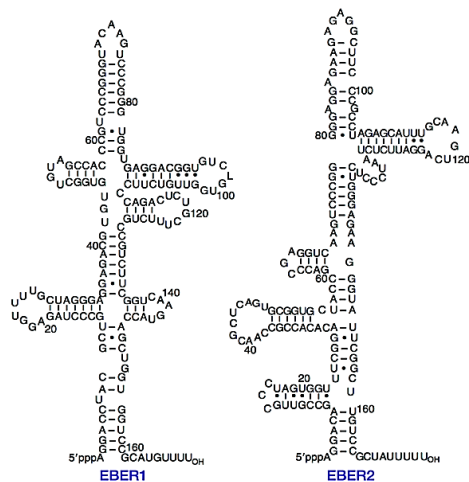


Figure 1.10 : Structures secondaires des EBER-1 et EBER-2. Reproduit de (Iwakiri et al., 2014).

Bien que les deux EBERs soient transcrits à des niveaux similaires (environ 10^7 copies par cellule infectée par l'EBV), EBER-1 est présent à un niveau 10 fois plus élevé par rapport à EBER-2, probablement en raison de sa plus longue demi-vie (Clarke et al., 1991).

L'hybridation *in situ* a montré que les EBERs se retrouvent principalement dans le noyau (Weiss et al., 1991; Khan et al., 1992). Cependant, il est possible qu'ils ne soient pas toujours strictement nucléaires. Des techniques hautement sensibles, telles que l'hybridation *in situ* à haute résolution et la microscopie à balayage, ont montré la présence des EBERs dans le cytoplasme des cellules B en interphase (Schwemmle et al., 1992 ; Iwakiri et Takada, 2010).

De plus, la capacité des EBERs à se lier à un certain nombre de complexes protéiques, localisés non seulement dans le noyau, mais aussi dans le cytoplasme (Clarke et al., 1991 ; Samanta et al., 2006 ; Lee et al., 2012), suggère que les EBERs peuvent avoir une localisation cytoplasmique. Plus remarquablement, il a été montré que l'EBER-1 peut être un composant des exosomes sécrétés qui bourgeonnent des cellules infectées par l'EBV. EBER-2 n'est quant à lui pas systématiquement sécrété (Ahmed et al., 2014).

b. Interactions protéiques et rôles des EBERs

Plus de 30 ans après leur découverte, le rôle des EBERs dans la latence virale n'est toujours pas complètement élucidé. Il a été observé que la délétion des EBERs dans des lymphocytes B infectés par l'EBV, dérivés de lymphocytes fraîchement isolés, n'altère pas la latence virale ou le potentiel tumorigène de ces cellules (Gregorovic et al., 2011 ; Ahmed et Khan, 2014). Ceci suggère que les EBERs ne sont pas essentiels pour l'immortalisation des lymphocytes B *in vitro*.

Cependant, d'autres travaux confirment que les EBERs jouent un rôle critique dans l'oncogenèse. Ainsi, la transfection des EBERs dans des cellules Akata dérivées de lymphome de Burkitt EBV-négatif restaure la capacité de croissance cellulaire dans la gélose molle. L'introduction de ces cellules chez des souris immunodéprimées provoque alors la formation de tumeurs. Ces effets s'expliquent par l'aptitude des EBERs à induire une résistance aux inducteurs apoptotiques (Nanbo et al., 2002 ; Wong et al., 2005). Une étude récente réalisée sur des souris transgéniques exprimant les EBERs dans le compartiment lymphoïde a corrélé cette expression avec le développement d'une hyperplasie lymphoïde et, dans certains, cas d'un lymphome (Repellin et al., 2010).

Il a été démontré que la capacité fonctionnelle des EBERs dépend des protéines cellulaires avec lesquelles ils interagissent ; jusqu'à présent, seul un petit nombre de protéines ont été identifiées comme capables de se lier et d'interagir directement avec les EBERs (Herbert et Pimienta, 2016):

(i) la protéine La (*Lupus Antigène*). La se lie à l'ARN polymérase III. L'importance de l'interaction La-EBER est inconnue. Des études antérieures ont montré que la protéine La peut-être excrétée dans les exosomes, favorisant ainsi la possibilité que les EBER soient également sécrétés et transférés aux cellules voisines via des exosomes (Kapsogeorgou et al., 2005 ; Fok et al., 2006(a)).

(ii) la protéine ribosomale L22. L'importance de cette interaction est également mal connue, même si une étude a suggéré que les fonctions cellulaires de L22 pourraient impliquer son association avec la télomérase humaine (Fok et al 2006(b) ; Houmani et al., 2009 ; Houmani et Ruf, 2009).

(iii) la protéine kinase R (PKR) dépendante de l'ARN à double brin dsARN. Les EBER se lient à PKR et inhibent sa phosphorylation (Figure 1.11). PKR inactivée inhibe à son tour au moins trois voies différentes impliquant : le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α , IKK α /IKK β (IkB kinase α/β) et FADD (*Fas-Associated Death Domain*).

- L'inhibition de la phosphorylation du facteur eIF2 α conduit à l'inhibition de la traduction et de la poursuite de la synthèse protéique, et inhibe donc l'apoptose (Nanbo et al., 2005).

- L'inhibition de la phosphorylation d'IKK α /IKK β empêche la libération de NF-kB et donc la transcription de cytokines antivirales telles que l'interféron de type I (IFNs-1). Les EBER bloquent ainsi la réponse cellulaire contre l'EBV (Sharp et al., 1993 ; Ahmed et Khan, 2014)

- L'inhibition de la voie FADD bloque l'apoptose par l'intermédiaire des caspases (Balachandran et al., 1998 ; Clemens, 2006).

(iv) RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) et le récepteur TLR3 (*Toll-like 3*). Ces deux interactions conduisent à l'activation du facteur de transcription IRF3 (*interferon regulatory transcription factor 3*) et à sa translocation vers le noyau, où il déclenche la transcription du facteur de croissance IGF-I et de l'interleukine-10 (IL-10), stimulant ainsi la croissance autocrine des cellules infectées (Samanta et al., 2006 ; Iwakiri et al., 2009 ; Iwakiri, 2014).

(v) Le facteur de liaison d'éléments riches en UA 1 (AUF-1). Cette interaction a été démontrée récemment, et sa signification n'est pas claire. Les études supposent que via cette voie, EBER-1 peut inhiber la dégradation des ARNm (Lee et al., 2012).

(vi) Le facteur de transcription Pax5. En effet, EBER-2 forme un complexe avec le facteur de transcription cellulaire Pax5 (Lee et al., 2015). De plus, l'étude de la protéomique des cellules BJAB exprimant les EBER a récemment révélé une augmentation de 1,5 fois des quantités d'ARNm codant pour la protéine Pax5 en réponse à l'expression d'EBER-1 et EBER-2 (Pimienta et al., 2015).

Outre la possibilité de former des complexes avec des protéines de la cellule hôte, EBER-1 peut aussi interagir avec la protéine virale EBNA-1. Ces deux éléments sont exprimés dans

les trois types de latence virale où EBNA-1 active la transcription des EBERs (Owen et al., 2010).

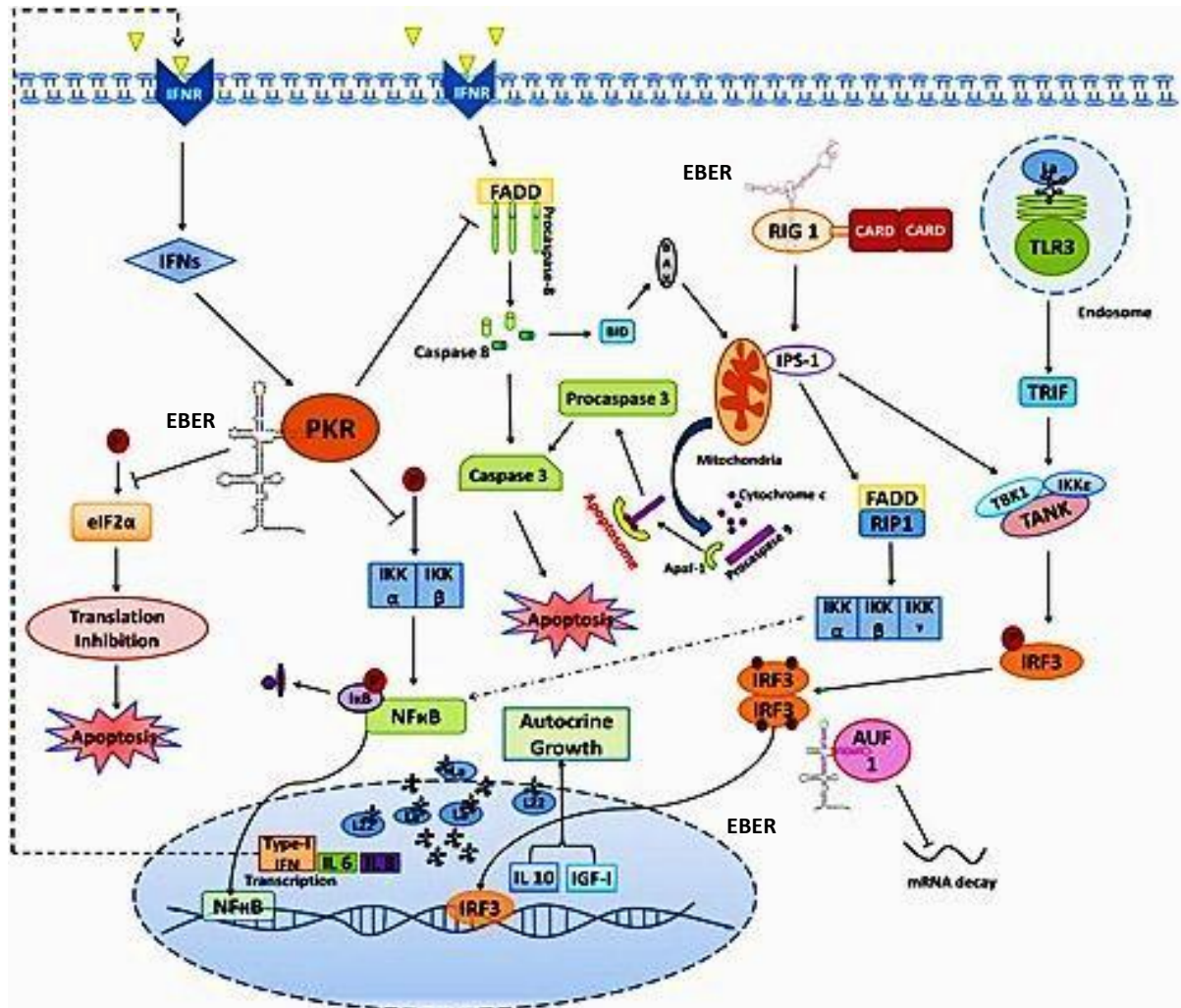


Figure 1.11: Le labyrinthe des interactions des EBERs dans les cellules infectées par l'EBV (Ahmed et Khan., 2014).

1.3.1.3.2. Les microARN (miARN)

Un microARN est une petite molécule d'ARN non codante contenant environ 22 nucléotides, et codée dans les introns ou les exons de gènes codants. Le précurseur du miARN est produit par transcription, puis subit une maturation sous l'action notamment des protéines Drosha et Dicer. Les miARN matures sont des régulateurs traductionnels capables d'éteindre l'expression des gènes cibles ; leurs mécanismes d'action est double, ils peuvent soit interagir avec l'extrémité 3' polyA des ARNm cibles et induire leur dégradation, soit interagir d'une façon à bloquer la traduction (Figure 1.12) (Bartel, 2004).

Les miARN ont un rôle oncogène quand ils ciblent des gènes suppresseurs de tumeur, et un rôle suppresseur de tumeur quand ils ciblent des oncogènes (Nana-Sinkam et Croce, 2011). Plusieurs études ont montré que la dérégulation de certains miARN induit une carcinogenèse dans divers organes (Happel et al., 2016 ; Chen et al., 2017).

Le génome de l'EBV code également pour des miARN, il existe 25 précurseurs de miARN, codés dans les deux régions BHRF-1 (*Bam HI fragment H rightward open reading frame 1*) et BART (*BamHI A region rightward transcrits*) du génome de l'EBV. La maturation des miARN précurseurs permet la production de 44 miARN matures (Barth et al., 2011 ; Marquitz et al., 2014).

Plusieurs études ont décrit l'expression des miARN encodés par l'EBV dans les tumeurs malignes associées à l'EBV, y compris le NPC et les CGaEBV et ont montré que des miARN viraux spécifiques jouaient un rôle important dans la régulation de la transformation des cellules B induite par l'EBV, ainsi que des rôles dans la carcinogenèse associée à l'EBV (Chan et al., 2012 ; Qiu et al., 2014).

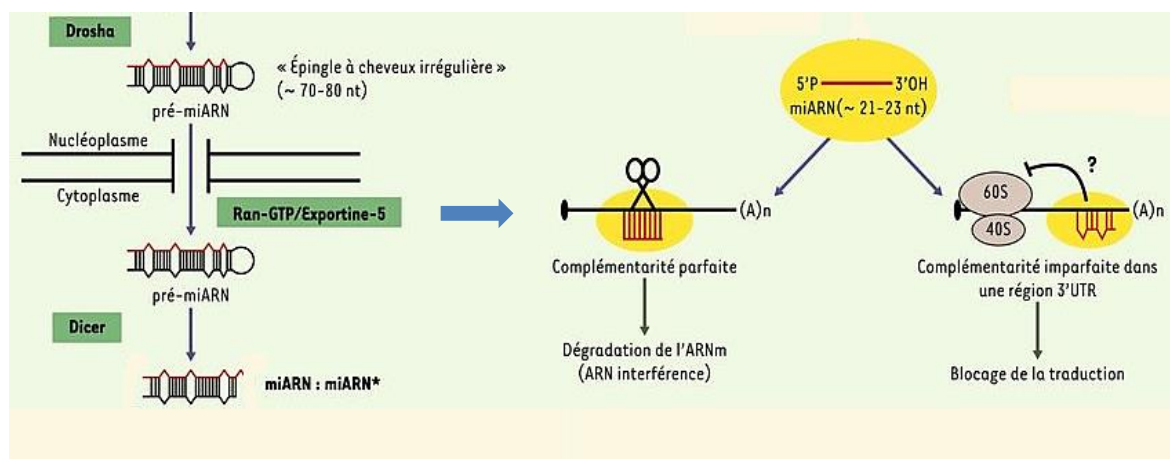


Figure 1.12 : Biosynthèse et modalité d'action des micro ARNs (Cavaillé., 2004).

L'expression des miARN de BHRF-1 (miR-BHRF1) est limitée à la latence III, et seuls les miR-BART ou BART sont exprimés dans les malignités épithéliales associés à l'EBV de latence I et II, ceci particulièrement dans le GCaEBV, et non pas dans les lymphocytes transformés par l'EBV (Marquitz et Raab-Traub, 2011 ; Strong et al., 2013).

Le rôle des BART est encore mal connu; des études suggèrent leur implication dans la régulation de l'expression des gènes viraux et des gènes de l'hôte dans la pathogenèse associée à l'EBV (Tsao et al., 2015).

Les BART ont été divisés en trois groupes : cluster-1, cluster-2 et mi-BART2. Les miR-BART1-5p, -16 et -17 appartiennent au cluster-1 et régulent négativement l'expression de LMP-1, permettant ainsi la diminution de sa présentation au CMH et contrôlant la réponse immunitaire anti LMP-1 (Lo et al., 2007). D'autre part, plusieurs miR-BART du cluster-1 affectent directement l'apoptose en ciblant différentes protéines pro-apoptotiques (Vereide et al., 2014 ; Kang et al., 2015). En plus de ces effets intrinsèques, les miR-BART peuvent protéger les cellules épithéliales néoplasiques infectées par l'EBV de la réponse immunitaire de l'hôte (Nachmani et al., 2009 ; Haneklaus et al., 2012).

Plusieurs de ces transcrits ont des cadres de lecture ouverts (ORF) dans la région BART tels que BARF-1, BARF-0, RPMS-1 et A73, qui codent probablement pour des protéines. En effet, il est possible de produire ces protéines *in vitro*, grâce à un système de traduction artificiel. Cependant, l'expression endogène de ces protéines n'a pas été complètement confirmée dans les tissus cancéreux associés à l'EBV (Smith et al., 1993 ; Sadler et al., 1995).

La protéine BARF-1 est capable d'immortaliser *in vitro* les cellules primaires de reins de singe. Les résultats de Danve et al. (2001) ont montré que l'on peut détecter l'expression du gène *BARF-1* dans des cellules épithéliales primaires immortalisées par les virions d'EBV isolés à partir de biopsies de patients atteints de NPC. D'autre part, BARF-1 est capable de transformer *in vitro* les fibroblastes de rongeurs et les cellules humaines épithéliales du nasopharynx (Jiang et al., 2009).

BARF-1 a été détecté par RT-PCR dans les tumeurs du NPC et les CGaEBV (Seto et al., 2005). Ceci suggère que *BARF-1* est exprimé comme un gène latent dans ces tissus cancéreux, et que la protéine BARF-1 peut avoir un rôle dans la pathogenèse de ces tumeurs. BARF-1 peut être sécrétée dans le milieu de culture des cellules épithéliales humaines infectées par l'EBV (Sall et al., 2004 ; Turenne-Tessier et al., 2005) et dans la salive et le sérum sanguin de patients atteints de NPC (Houali et al., 2007).

BARF-1 est capable d'activer le gène pro-apoptotique *Bcl-2* et le gène *c-Myc* impliqué dans la tumorigénèse, au sein de cultures de cellules épithéliales infectées par l'EBV.

BARF-0 est exprimé dans les cellules infectées par l'EBV *in vitro* (Fries et al., 1997). Cependant, malgré son abondance dans les NPC, il est difficile d'affirmer si ce transcrit est réellement traduit en protéine dans les cellules tumorales.

Les protéines produites *in vitro* à partir des ORF RPMS1 et A73 fonctionnent comme des régulateurs négatifs des voies de signalisation NOTCH et RACK1, respectivement (Smith et al., 2000 ; Al-Mozaini et al., 2009 ; Lung et al., 2013).

Chapitre 1: Le virus d'Epstein Barr

Les principaux rôles des gènes de latence du virus EB sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 1.1 : Les rôles des différents gènes latents codés par l'EBV pendant la latence et le développement tumorale d'après (Ali et al., 2015).

Gènes de latence	Rôles des gènes
EBNA-1	Activateur de transcription des gènes latents viraux et des gènes de l'hôte; Responsable de la réplication des épisomes, de la ségrégation et de la persistance du génome viral; Impliquée dans l'oncogenèse.
EBNA-LP	Co-activateur transcriptionnelle des gènes viraux et cellulaire dépendante de EBNA-2. Se lie à CBF1/ RBP-J kappa.
EBNA-2	Active la transcription génique de tous les gènes viraux et certains gènes cellulaires.
EBNA-3A	Activateur et répresseur de la transcription. Limite la transcription activée par EBNA-2 dépendante de CBF1/ RBP-J kappa.
EBNA-3B	Activateur et répresseur de la transcription. Bloque l'action de la p53 et Rb
EBNA-3C	Activateur et répresseur de la transcription. Limite la transcription activée par EBNA-2 dépendante de CBF1/ RBP-J kappa. Favorise la prolifération cellulaire et perturbe le cycle cellulaire.
LMP-1	Oncogène majeur, imite le récepteur CD40, active les voies de signalisation NF-κB, JNK, JAK/STAT, MAP kinase, AKT. Bloque l'apoptose et améliore la survie et la croissance cellulaire, induit l'adhésion cellulaire.
LMP-2A	Responsable de l'activation de la voie ERK/MAPK et PI3K/AKT; Bloque la signalisation dépendante de l'antigène BCR. Bloque la réactivation virale.
LMP-2B	Module les fonctions de LMP-2A in vitro
EBER-1 EBER-2	Augmente la formation de colonies et induit la croissance in vitro; Confère la résistance des cellules à l'apoptose dépendante de la PKR; Induit des cytokines et module la réponse immunitaire innée; Contribue à l'oncogenèse.
miARN	maintiennent des cellules infectées en phase latente. Les miARN de BHRF1 et de BART agissent sur l'apoptose.

1.4. L'infection lytique

Après l'infection primaire, l'EBV persiste à l'état latent pendant toute la vie de l'individu, et il peut réactiver périodiquement son cycle lytique afin de pouvoir infecter de nouveaux hôtes. Suite à une stimulation antigénique du BCR, le lymphocyte B mémoire infecté reçoit un signal de différenciation cellulaire et se transforme en plasmocyte. La différenciation cellulaire induit la réactivation du cycle lytique de l'EBV, dont les virions néo-synthétisés infectent d'autres lymphocytes B (naïfs ou mémoires), ainsi que les cellules épithéliales de l'oropharynx (Laichalk et Thorley-Lawson, 2005; Thorley-Lawson, 2005).

De récentes études suggèrent le rôle des monocytes-macrophages et des cellules de Langerhans comme hôtes intermédiaires permettant à l'EBV d'accéder aux couches superficielles de l'épithélium, afin d'y établir son infection lytique (Tugizov et al., 2007 ; Walling et al., 2007). Les cellules épithéliales sont le siège d'une intense réplication virale, permettant une excrétion périodique ou durable du virus dans la salive (Hadinoto et al., 2009).

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). Le cycle lytique peut être induit sur des modèles expérimentaux par plusieurs agents chimiques (esters de phorbol, butyrate de sodium ou 5-azacytidin) ou bien biologiques anti-immunoglobuline de surface, facteur de croissance tumorale TGF β ou vecteur exprimant les protéines activatrices de la réplication comme ZEBRA, EB1 (Ben-Sasson et Klein, 1981 ; Takada, 1984 ; Fahmi et al., 2000).

Lors de son cycle réplcatif, le virus, dont le génome est alors linéaire et extra-chromosomique, utilise la machinerie enzymatique virale ainsi que 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. Après l'induction du cycle lytique, les gènes dits très précoces sont exprimés et activent les gènes précoces, qui induisent la réplication du génome viral et la transcription des gènes tardifs. Les produits de ces gènes tardifs sont essentiels à l'assemblage et à la maturation des particules virales infectieuses.

1.4.1. Les protéines très précoces (*Immediate Early Antigens, IEA*)

Le passage de la phase de latence vers la phase lytique nécessite la synthèse de deux protéines très précoces. ZEBRA (*Bam HI Z Epstein-Barr virus Replication Activator*)

encodée par BZLF1, également appelé Zta, est la protéine clé de la transactivation, et coopère avec la protéine Rta (*R transactivator*), encodé par BRLF1. La transcription des gènes très précoces est assurée par des protéines déjà présentes dans les cellules infectées, mais ne serait activée que lors du déclenchement de la réplication par des modifications épigénétiques de type méthylation du promoteur (Feederle et al., 2000 ; Petosa et al., 2006).

ZEBRA peut se lier à *oriLyt* et est suffisante pour induire la suppression de la latence du virus dans les lymphocytes B, et leur entrée dans le cycle lytique. Elle peut interagir avec NF- κ B et réguler négativement l'expression des protéines de la famille EBNA, ce qui induit le passage de la phase latente à la phase lytique. ZEBRA altère également le cycle cellulaire et le bloque en phase G1/S (Israel et Kennedy, 2005) via l'inhibition de la cycline A et de c-myc. Cette inhibition de la réplication de l'ADN cellulaire assure la réplication du génome viral. À son tour, Rta se lie à *oriLyt* et semble jouer un rôle dans la commutation latence-cycle lytique (Dickerson et al., 2009).

1.4.2. Les protéines précoces (*Early Antigens*, EA)

Des études à l'échelle du génome ont identifié 38 ARNm lytiques précoces. Plusieurs de ces ARNm codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN viral, comme l'ADN polymérase (BALF5) et son facteur de récessivité (BMRF1), une protéine majeure de liaison à l'ADN (BALF2), la ribonucléotide réductase (BaRF1), la thymidine kinase (BXLF1), l'exonucléase alcaline (BGLF5), le complexe hélicase/primase (BBLF4/BSLF1), un composant épissé du complexe hélicase/primase (BBLF2/3) et l'uracil ADN glycosylase (BKRF3) (Lu et al., 2006(a)).

Les gènes précoces codent pour des protéines impliquées dans la réplication de l'ADN, l'inhibition de l'apoptose, l'évasion du système immunitaire, et la régulation des gènes tardifs. Certaines protéines ne font pas directement partie du complexe de réplication, mais sont importantes pour la réplication virale. Elles interviennent dans le métabolisme et la régulation des ARNs, permettant la production de substrats nucléotidiques dans les cellules non répliquatives.

Certaines protéines, en revanche, sont impliquées dans des fonctions indépendantes de la réplication du génome viral. Par exemple, la protéine encodée par le cadre de lecture BHRF1, qui présente des homologies avec Bcl-2 (anti-apoptotique), permet une meilleure réplication virale en prévenant la mort de la cellule hôte. De même, la protéine BARF-1 protège le virus

des monocytes macrophages en empêchant ces cellules de sécréter de l'interféron (Cohen et Lekstrom, 1999 ; Elegheert et al., 2012).

1.4.3. Les protéines tardives

Les gènes tardifs sont exprimés après la réplication du génome viral, et codent pour des protéines structurales impliquées dans la formation du virion. Les protéines tardives (BNRF1, BFRF2/3, BLRF1/2/3, BCLF1) interviennent dans la formation de la capside virale. Elles s'assemblent de façon autonome par des interactions protéine-protéine (Henson et al., 2009). Les glycoprotéines permettant l'attachement et la pénétration dans la cellule hôte (gp350/220, gH-gL, gp42 et gB) sont exprimées par les protéines tardives BLLF1, BXLF2, BZLF2 et BKRF2. Certaines protéines comme BCLF1, présentant une homologie de structure avec IL10, permettent la protection du virus contre les réponses immunitaire (Salek-Ardakani et al., 2002).

CHAPITRE 2

LE CANCER GASTRIQUE ASSOCIE AU VIRUS D'EPSTEIN-BARR

2.1. Le cancer gastrique

2.1.1. Données épidémiologiques

Le cancer de l'estomac est très fréquent dans le monde, selon la base de données GLOBOCAN appartenant à l'Agence Internationale de la Recherche sur le Cancer/Organisation Mondiale de la Santé (IARC/OMS), près de 951 600 nouveaux cas ont été estimés en 2012 (soit 6,8% du total) (Ferlay et al., 2015 ; Torre et al., 2016), ce qui fait du cancer de l'estomac la cinquième malignité la plus fréquente dans le monde, après les cancers du poumon, du sein, du colo-rectum et de la prostate. Cela représente un changement substantiel depuis les premières estimations en 1975, lorsque le cancer de l'estomac était le néoplasme le plus fréquent (Fock., 2014).

Il existe des variations géographiques considérables dans l'incidence du CG dans le monde. En effet, plus de 70% des cas (677 000 cas) sont enregistrés dans les pays en développements (456 000 chez les hommes et 221 000 chez les femmes). La moitié du total mondial survient en Asie de l'Est (principalement en Chine), l'Amérique du sud et l'Europe de l'Est et du Sud sont des régions à risque élevé, cependant, l'Afrique est une région à risque faible.

Les taux d'incidences normalisés selon l'âge sont deux fois plus élevés chez les hommes que chez les femmes, allant de 3,3 en Afrique de l'Ouest à 35,4 en Asie de l'Est pour les hommes et de 2,6 en Afrique de l'Ouest à 13,8 en Asie de l'Est pour les femmes, ces incidence sont pour 100 000 habitants (Figure 2.13) (Fitzmaurice., 2015).

Le cancer de l'estomac est la troisième cause de décès par cancer chez les deux sexes dans le monde (723 100 décès, soit 8,8% du total). Les taux de mortalité les plus élevés sont estimés en Asie de l'Est (24 pour 100 000 chez les hommes, 9,8 pour 100 000 chez les femmes), les plus faibles en Amérique du Nord (2,8 et 1,5 respectivement) (Figure 2.14).

Des taux de mortalité élevés sont également présents pour les deux sexes en Europe centrale et orientale et en Amérique centrale et en Amérique du Sud. Le pronostic du cancer de l'estomac reste délicat avec un taux de survie d'environ 15% à 5 ans (Fitzmaurice., 2015 ; Ferlay et al., 2015).

Les études épidémiologiques ont révélées une baisse régulière de l'incidence du cancer de l'estomac et des taux de morbidité depuis le milieu du XXe siècle dans la majorité des pays développés comme l'Amérique du Nord et l'Europe. (Howson et al., 1986 ; Malvezzi et al., 2010 ; Terro et al., 2015). Des tendances décroissantes semblables ont été notées ces dernières années dans les régions où les taux du CG sont élevés, y compris plusieurs pays d'Asie (Japon, Chine et Corée), d'Amérique latine (Colombie et Équateur) et d'Europe

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

(Ukraine) (Bertuccio et al., 2009). Ceci s'explique par l'amélioration de la diététique, l'augmentation de la disponibilité des fruits et des légumes frais riche en vitamines C et E qui ont un rôle protecteur, la réduction de la consommation des aliments salés et conservés et la réduction de l'infection chronique par *H. pylori* en raison de l'amélioration de l'hygiène publique et la prise d'antibiotiques (Parkin., 2006) ; de l'autre côté, les pays développés connaissent une baisse de la prévalence du tabagisme depuis l'an 2012 qui peut aussi expliquer une partie la diminution de l'incidence du CG (Jemal et al., 2010 ; Bertuccio et al., 2009).

International Agency for Research on Cancer



World Health Organization

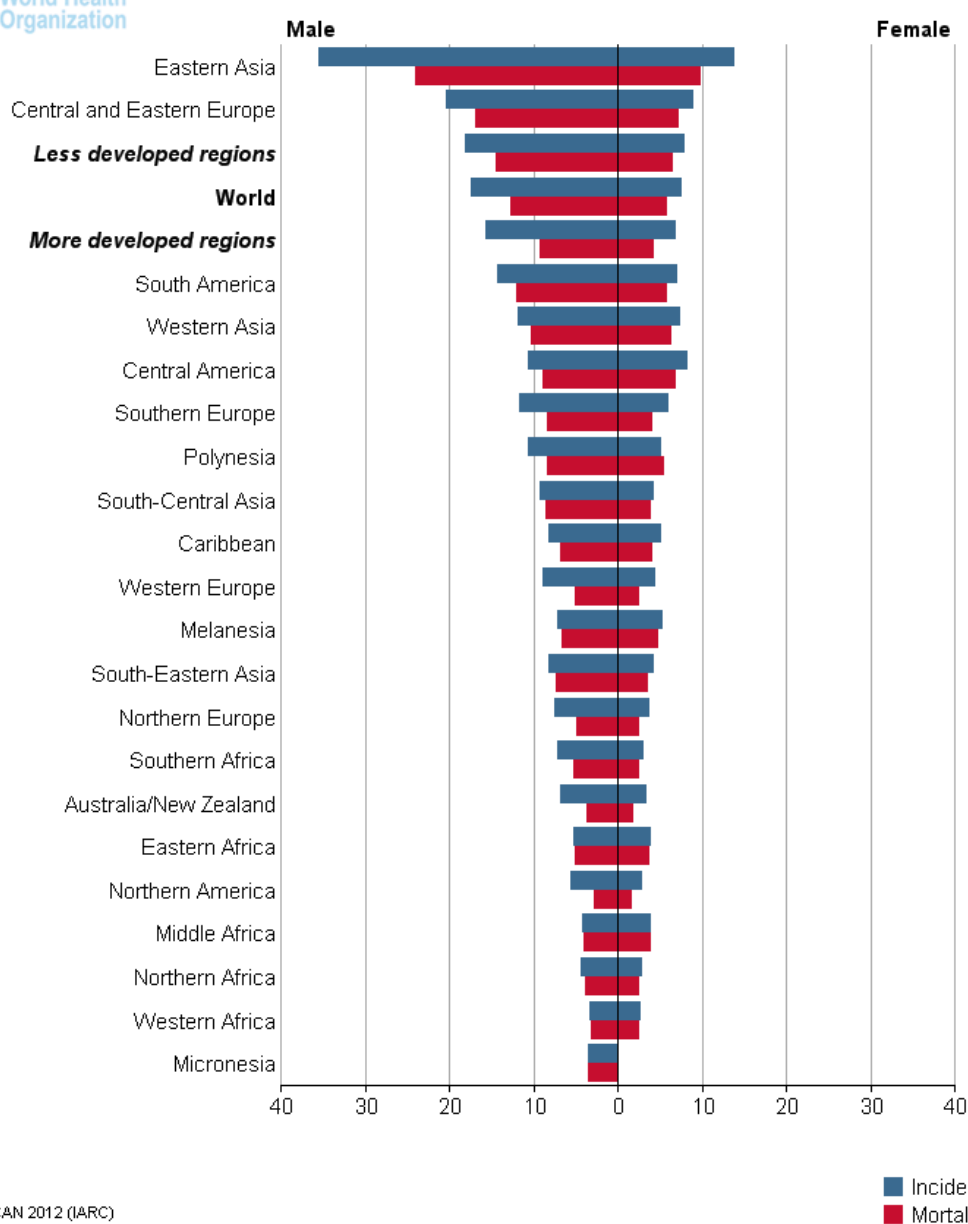


Figure 2.13 : Distribution géographique des taux d'incidences et de mortalité du cancer gastrique en 2012. Taux estimés selon l'âge pour 100 000 habitants (Ferlay., 2015).

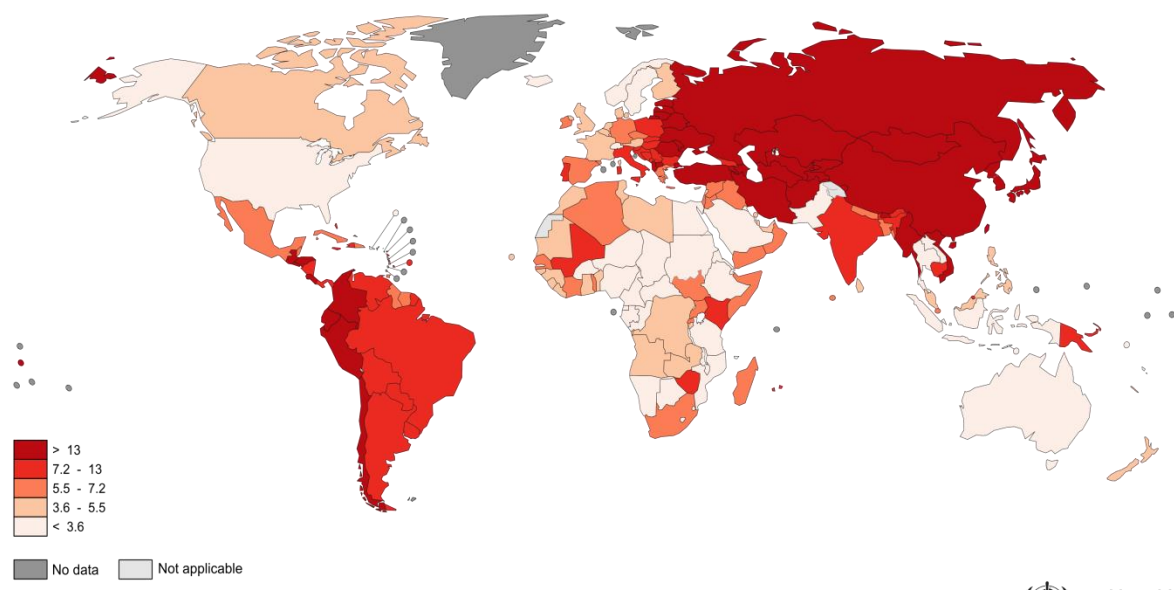


Figure 2.14 : La mortalité due au cancer de l'estomac dans le monde estimée en 2012 (Ferlay., 2015).

En Afrique du Nord il y a près de 5700 nouveaux cas de CG chaque année enregistrés avec une incidence de 4.3 pour 100 000 hommes et 2.7 pour 100 000 femmes, les taux de mortalité sont équivalents à 3.9 pour 100 000 hommes et 2.4 pour 100 000 femmes (Asombang et al., 2014 ; Ferlay et al., 2015).

En Algérie, le CG gastrique chez l'homme occupe le 5ème rang des cancers, soit 5.5% après ceux du poumon (18,0%), le colo-rectum (9,6%), la vessie (9,1%) et la prostate (6,5%); et le 2ème rang des cancers digestifs après le cancer colorectal.

Chez la femme, il occupe le 9ème rang des cancers avec un pourcentage égale à 2.4% après le cancer du sein (36,4%), le colon-rectum (8,5%), le col utérin (6,0%), la thyroïde (6,0%), la vésicule biliaire (4,4%), les poumon (3,6%), les lymphomes non hodgkiniens (3,3%) et les leucémies (3,2%) ; il est également le 3ème rang des cancers digestifs après le colo-rectum et la vésicule biliaire (Hamdi Cherif et al., 2014).

Selon une étude effectuée par Hamdi Cherif et ses collaborateurs (2014), les taux globaux d'incidence des principaux sites de cancer ont augmenté régulièrement chez les deux sexes pendant les dernières 25 ans en Algérie. Ils ont observé également que la survie à 5 ans est faible pour les principales tumeurs en raison d'un accès difficile aux soins du cancer et à un cadre de soins de santé incomplet pour les patients cancéreux.

L'augmentation de l'incidence a été expliquée par l'augmentation de l'espérance de vie, au changement de style de vie, au changement d'environnement et à la transition épidémiologique et démographique.

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

Par contre, cette étude a révélé également une diminution des taux d'incidence du cancer de l'estomac de façon continue chez les hommes pendant les dernières 25 ans. Chez les femmes, les taux ont diminué de l'an 1996 à 2000 et se sont stabilisés par la suite ; le groupe d'âge 15-44 a montré des diminutions statistiquement significatives pour le cancer de l'estomac pour les deux sexes. Il est bien de signaler que les taux d'incidence du cancer du nasopharynx ont augmenté jusqu'à l'an 2000 et ont diminué par la suite.

En Algérie, les aliments traditionnellement conservés tels que «harissa», les fruits et légumes marinés, la viande ou la graisse séchée et salée, le beurre rance et les fumées domestiques sont consommés en grande quantité. Ces aliments ont été décrits comme des facteurs de risque en commun pour le CG et le NPC (Feng et al., 2007; Feng et al., 2009; Hamdi Cherif et al., 1991).

La réduction des incidences du cancer de l'estomac et le NPC peut être attribuée à la baisse de la consommation de ces aliments et la tendance à adopté un régime riche en fruits et légumes et probablement la réduction de la prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* dans cette région (World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research., 2007).

2.1.2. Anatomie et organisation histologique de l'estomac

L'estomac est une dilatation du tube digestif placée entre l'œsophage et le duodénum, se situe dans le haut de l'abdomen, sous le diaphragme et occupe la région épigastrique. Il est en forme de poche d'une longueur totale de 15 à 25 cm, à l'âge adulte il contient 50 ml à vide, et peut contenir jusqu'à 3 ou 4 litres d'aliments ou de liquides.

L'estomac permet d'assurer la digestion par ses fonctions mécaniques (brassage) et chimiques en mélangeant les aliments aux sucs gastriques (eau, acide chlorydrique, enzymes). Pour une digestion idéale, le pH de l'estomac est compris entre 1,5 (pendant la nuit) et 5 (en début de digestion) : les enzymes gastriques fonctionnent à pH acide. Le produit de la transformation par l'estomac est une pâte, appelée chyme qui se déverse dans le duodénum par le pylore.

L'estomac se caractérise de face par une forme en J et présente une ouverture en haut, le cardia, qui permet la jonction avec l'œsophage. Il comprend le sphincter œsophagien inférieur et le pylore à sa sortie vers le duodénum en bas (figure 2.15).

On distingue deux courbures : la petite courbure vascularisée par les artères et veines gastriques gauche et droite ; la grande courbure vascularisée par les artères et veines gastro-épiploïques gauche et droite.

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

L'estomac est composé de trois parties, dont les muqueuses sécrètent toutes du mucus protecteur contre une autodigestion, de haut en bas :

- le fundus : ou grosse tubérosité de l'estomac est la région en forme de dôme qui se niche sous le diaphragme et fait saillie au-dessus et à côté du cardia.
- le corps : est la portion moyenne qui se prolonge vers le bas par la partie pylorique en forme d'entonnoir.
- l'antré : sa portion supérieure large rétrécit pour donner le canal pylorique se termine par le pylore qui communique avec le duodénum.

La paroi de l'estomac est formée de la profondeur vers la surface de plusieurs couches : la muqueuse constituée de l'épithélium et la lamina propria puis la sous muqueuse, suivie par les trois couches musculaires (longitudinal, oblique et circulaire) puis la sous séreuse et la séreuse qui est la membrane recouvrant l'extérieure de l'estomac (Marieb et Hoehn., 2014).

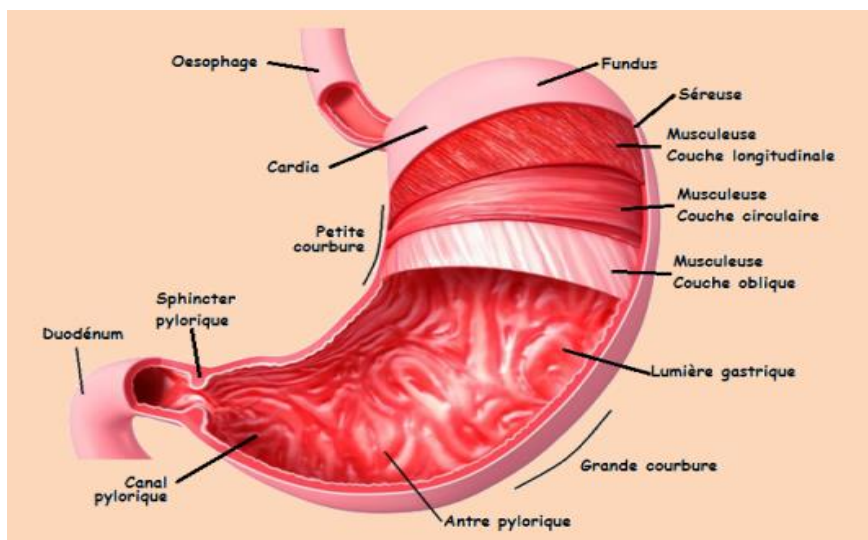


Figure 2.15 : Représentation schématique des différentes parties de l'estomac (Marieb et Hoehn., 2014).

2.1.3. Les lésions précancéreuses

Les lésions précancéreuses sont des anomalies histopathologiques détectables avant l'apparition d'un cancer. Deux lésions gastriques répondent à la définition des lésions pré-néoplasiques: l'une, assez fréquente est la gastrite chronique avec atrophie gastrique progressive qui est généralement liée à une infection par *H. pylori*; l'autre, beaucoup plus rare, est le polype adénomateux hyperplasiques. La voie d'évolution vers la cancérisation est dans les deux cas une métaplasie intestinale et surtout une dysplasie d'intensité variable.

La dysplasie sévère a une réelle signification pré-néoplasique et un risque élevé de développer un cancer. L'état dysplasique peut être diagnostiqué par l'examen anatomopathologique, cytologique et/ou histologique, l'architecture tissulaire est caractérisée par une augmentation de la densité cellulaire, diminution de la différenciation cellulaire, anomalies de la polarité cellulaire, désorganisation de l'épithélium; l'aspect cytologique démontre des mitoses en nombre augmenté, augmentation des rapports nucléocytoplasmiques, anisocytose et anisocaryose (Fenoglio-Preiser et al., 2000).

2.1.4. Classification des tumeurs gastriques

Les cancers de l'estomac peuvent se développer aux dépens des différents éléments de sa paroi : épithélium, muscle, graisse ou tissu lymphoïde. Les principales tumeurs malignes de l'estomac sont les adénocarcinomes, les lymphomes, les tumeurs stromales gastro-intestinales et les tumeurs neuroendocriniennes. Les adénocarcinomes se développent aux dépens de l'épithélium glandulaire et représentent environ 95% des tumeurs malignes de l'estomac.

Plusieurs classifications histologiques des cancers gastriques ont été proposées. Les plus utilisées sont celles de Lauren et de l'Organisation Mondiale de la Santé OMS (WHO) et la plus récente est la classification du (TCGA) (The Cancer Genome Atlas). La classification du CG est importante pour sélectionner les patients qui peuvent bénéficier des thérapies ciblées ou pour prédire précisément le pronostic.

a. Classification de Lauren

Depuis sa création en 1965, la classification Lauren est devenue la classification histologique la plus utilisée et la plus acceptée pour le CG, elle est corrélée à l'évolution des tumeurs (Lauren., 1965). Elle détermine deux types histologiques différents sont, le type intestinal et le type diffus; Plus tard, un autre type a été inclus appelé type indéterminé pour décrire une histologie peu commune (Leocata et al., 1998). Les fréquences relatives sont d'environ 54% pour le type intestinal, 32% pour le type diffus et 15% pour le type indéterminé (Polkowski et al., 1999).

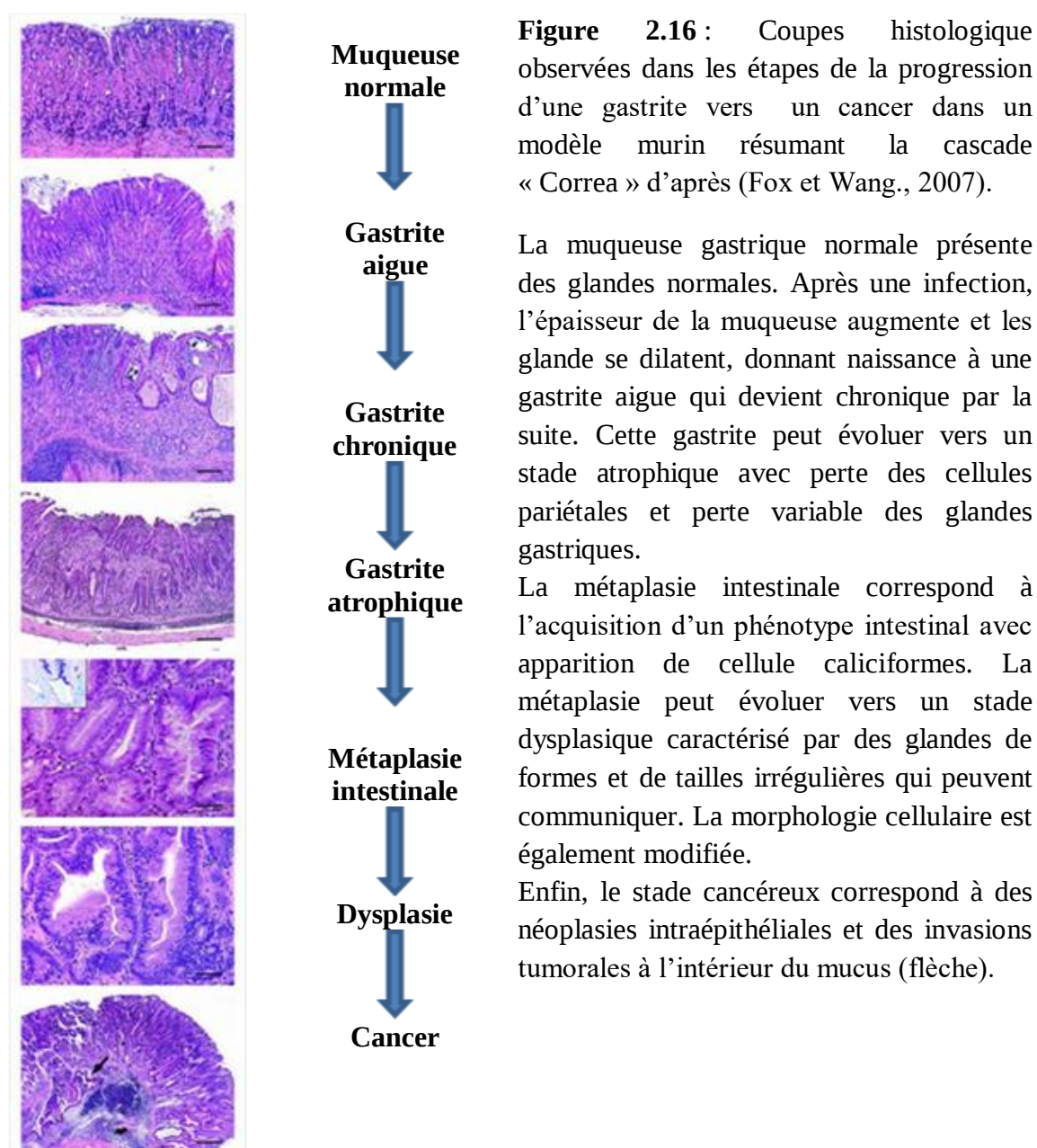
• Les adénocarcinomes de type intestinal

La forme intestinale présente la structure d'un adénocarcinome tubulé ou papillaire bien à moyennement différencié, compacte, bien limité en périphérie, rappelant l'épithélium intestinal d'où son nom. Le développement de ce type histologique est souvent lié aux facteurs environnementaux tels qu'une infection à *H. pylori*, aux facteurs alimentaires et aux

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

facteurs liés au style de vie. Il apparaît après une gastrite chronique atrophique évoluant lentement sur de nombreuses décennies, ce qui explique l'âge élevé d'apparition de ce cancer, en moyenne entre 70 et 80 ans.

L'évolution histopathologique suit des étapes bien définies ; qui commence par une inflammation chronique de la muqueuse gastrique évoluant lentement vers les stades pré-néoplasiques, l'atrophie gastrique, la métaplasie intestinale, la dysplasie et puis le cancer gastrique. La progression de cette cascade a été proposée pour la première fois par Correa appelée « cascade de Correa » (Figure 2.16). (Correa et al., 1975; Correa et al., 1988 ; Hu et al., 2012).



- **Les adénocarcinomes de type diffus**

La forme diffuse est surtout faite de cellules indépendantes mucosécrétantes et peu différenciées, se comportent agressivement et ont tendance à se disperser dans tout l'estomac (plutôt que de former des glandes) (Figure 2.17). Ce type se propage à d'autres parties du corps (métastases) beaucoup plus rapidement que les tumeurs de type intestinal. En comparaison avec les CG de type intestinal, les CG de type diffus sont moins liés aux influences environnementales, ont une incidence relative plus élevée, se produisent plus souvent chez les jeunes patients et sont associés à un mauvais pronostic, ce qui peut indiquer que les deux types intestinal et diffus adoptent des voies distinctes pour le développement tumoral.

La forme diffuse regroupe plusieurs types morphologiques d'adénocarcinomes, la forme la plus fréquente est constituée de cellules appelées cellules en bague à chaton à cause d'une large vacuole de mucine qui déplace le noyau à la périphérie de la cellule. D'autres formes existent sont mal différenciés, comme l'adénocarcinome de type solide et de type non-solide, le type solide est caractérisé par des cellules tumorales étroitement liées et une limite bien définie, par contre le type non solide est formé de cellules peu différenciées dispersées dans le stroma tumoral (Hu et al., 2012).

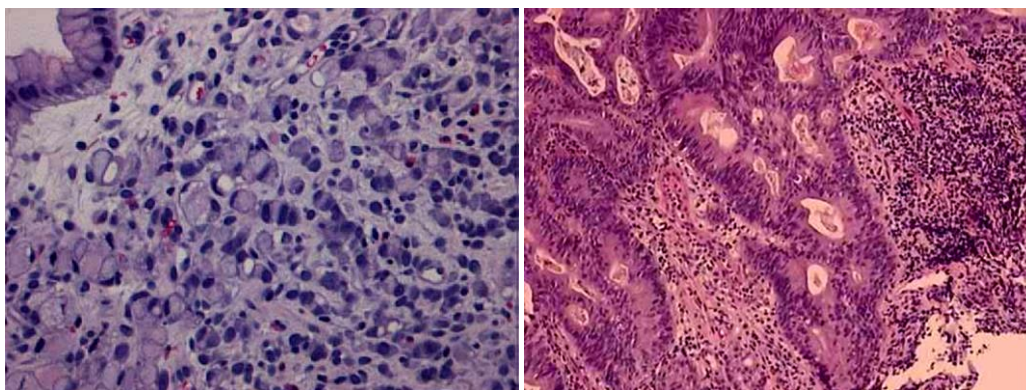


Figure 2.17: Coupe histologique des deux types de cancer gastrique distingués selon la classification de Lauren. A. adénocarcinome à cellules en bague à chaton (type diffus), B. adénocarcinome tubulaire (type intestinal) (Fenoglio-Preiser et al., 2000).

b. Classification de L'OMS

La classification de l'OMS publiée en 2010 semble être la plus détaillée parmi tous les systèmes de classification histopathologique, elle ne se limite pas aux adénocarcinomes mais inclut également des formes plus rares. (Tableau 2.2) (Fléjou., 2011). Ce système de classification est largement utilisé dans les laboratoires d'anatomo-pathologies pour le

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

diagnostic des CG et la description des néoplasmes peu fréquents, elle est également adoptée par de nombreuses études traitant les caractéristiques histopathologies du CG.

La classification de l'OMS détaille les sous-groupes d'adénocarcinomes en se basant sur les critères morphologiques sans valeur pronostique, et les quatre grands sous types sont :

- Adénocarcinome tubuleux, il est composé de petits tubes ou tubules ramifiés de différentes tailles.
- Adénocarcinome papillaire, cette tumeur croît hors de la paroi gastrique et comporte des excroissances en doigts de gant qui pointent vers l'intérieur de la cavité de l'estomac.
- Adénocarcinome mucineux, il est moins fréquent, caractérisé par la présence de mucine à l'extérieur des cellules cancéreuses qui constitue au moins 50% du volume tumoral.
- Carcinomes à cellules indépendantes (y compris le carcinome à cellules en bague à chaton et d'autres), sont caractérisées par la présence de cellules cancéreuses regroupées en paquets.

Les carcinomes mixtes, font partie des tumeurs rares, ils consistent en un mélange de différents types d'adénocarcinome gastrique. En plus des quatre principaux sous-types histologiques cités ci-dessus, la classification de l'OMS décrit d'autres variantes histologiques peu fréquentes, comme le carcinome adénosquameux, le carcinome à cellules squameuses et le carcinome indifférencié, le carcinome exocrine-endocrinien mixte, carcinome à petites cellules, carcinome pariétal, choriocarcinome, tumeur du sinus endodermique, carcinome embryonnaire, carcinome des cellules Paneth et adénocarcinome hépatoïde (Fléjou., 2011 ; Berlth et al., 2014).

Parmi les CG Les carcinomes gastriques à stroma lymphoïde sont des carcinomes de type lympho-épithéliales (lymphoepithelioma-like carcinoma LELC) appelé aussi carcinome médullaire, ils sont extrêmement rare d'une fréquence égale à 1 à 4%. Les LELC présentent de nombreuses similitudes histologiques avec les NPC indifférenciés. Plusieurs travaux ont confirmé que 80% à 90% de ce type de CG sont associés à l'EBV (Oda et al., 1993; Wang et al., 1999; Matsunou et al., 1996).

De plus, l'EBV est majoritairement détecté dans les LELC des régions géographiques de forte incidence pour le NPC La relation des LELC avec l'EBV explique la répartition géographique de ce type de cancer, caractérisée par une forte prédominance en Chine et au Japon. Il survient avec un maximum de fréquence chez les sujets âgés de 60 ans en moyenne, avec une nette prédominance masculine. Macroscopiquement, ce cancer est ulcéré et bien

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

limité, son histologie est caractérisée par la présence d'une infiltration lymphoïde massive entre les groupements cellulaires tumoraux et autour de la tumeur. Cet infiltrat est souvent de phénotype T, CD8+. Le pronostic de cette tumeur est significativement meilleur que celui du carcinome habituel, à degré d'envahissement équivalent (Park et al., 2015 ; lee et al., 2014).

Tableau 2.2 : Comparaison entre les deux systèmes de classification du cancer gastrique OMS et Lauren (Hu et al., 2012).

OMS (2010)	Lauren (1965)
Adénocarcinome papillaire Adénocarcinome tubulaire Adénocarcinome mucineux	Type intestinal
Carcinome en bague à chaton et d'autres carcinomes à cellules indépendantes	Type diffus
Carcinome mixte	Type indéterminée
Carcinome adénosquameux Le carcinome épidermoïde Adénocarcinome Hepatoid Carcinome à stroma lymphoïde (LELC) Choriocarcinome Carcinosarcome Carcinome des cellules pariétales Tumeur maligne rhabdoïde Carcinome mucoépidermoïde Le carcinome à cellules Paneth Carcinome indifférencié Carcinome mixte adéno-neuroendocrine Tumeur du sac vitellin Carcinome embryonnaire Adénocarcinome oncocytaire	

En dehors de la classification basée sur les critères morphologique, l'OMS a proposé une autre classification définissant le grade histologique de la tumeur qui dépend du degré de la différenciation des cellules tumorale et leurs vitesses de multiplication. Le grade histologique du cancer de l'estomac est chiffré de 1 à 3 :

- Le grade I, bien différencié: Un adénocarcinome avec des glandes bien formées, ressemblant souvent à l'épithélium intestinal métaplasique.
- Le grade II, moyennement différencié: Un adénocarcinome intermédiaire entre bien différencié et peu différencié.

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

- Le grade III, peu différencié: Un adénocarcinome composé de glandes très irrégulières qui sont reconnues avec difficulté, les cellules sont isolées ou disposées en petites ou grandes grappes avec des sécrétions de mucine ou des structures acinaires.

Concernant l'évaluation de l'extension tumorale, la classification TNM est reconnue comme standard international (Tableau 2.3). Elle a été basée sur les critères de l'Union International contre le cancer (UICC) et l'Association Japonaise contre le Cancer (AJC) de l'année 1997 (Roder et al., 1998). Cette classification définit le stade tumoral grâce à des informations sur la tumeur primaire (T), l'atteinte des ganglions régionaux (N) et la présence de métastases à distance (M). Chaque tumeur a sa propre classification TNM qui définit et intègre les critères anatomiques et pathologiques qui ont une importance pronostic.

La survie globale des patients atteints d'un CG dépend donc fortement du stade TNM. Celle-ci est estimée à 5 ans pour les stades IA, IB, II, IIIA, IIIB et IV, respectivement à 78 %, 58 %, 34 %, 20 %, 8 % et 7 % (Hundahl., 2000).

Tableau 2.3a : Classification clinique TNM des tumeurs de l'estomac (Hundahl et al., 2000).

T	Tumeur primitive
Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive.
T0	Pas de signes de tumeur primitive.
Tis	Carcinome in situ : tumeur intra-épithéliale sans invasion de la lamina propria, dysplasie de haut grade.
T1	T1a : Tumeur envahissant la lamina propria ou la musculaire muqueuse. T1b : Tumeur envahissant la sous-muqueuse.
T2	Tumeur envahissant la musculature
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse.
T4	T4a : Tumeur perforant la séreuse. T4b : Tumeur envahissant les structures adjacentes.
N	Adénopathies régionales
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies.
N0	Pas de signe d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux
N1	Envahissement de 1 à 2 ganglions lymphatiques régionaux.
N2	Envahissement de 3 à 6 ganglions lymphatiques régionaux.
N3	N3a: Envahissement de 7 à 15 ganglions lymphatiques régionaux. N3b: Envahissement de 16 ou plus ganglions lymphatiques régionaux.
M	Métastases à distance.
M0	Pas de métastases à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

Tableau 2.3b : Les différents stades du cancer gastrique basés sur la classification TNM (Hundahl et al., 2000).

Stade du cancer	T	N	M
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1	N0	M0
Stade IB	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Stade IIA	T2	N1	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
	T3	N1	M0
Stade IIIA	T3	N2	M0
	T2	N3	M0
	T4a	N1	M0
Stade IIIB	T3	N3	M0
	T4b	N0-N1	M0
	T4a	N2	M0
Stade IIIC	T4a	N3	M0
	T4b	N2-N3	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1

c. Classification de TCGA

Les critères classiques de classification du CG ont été fondés sur l'aspect histologique (comme Lauren et l'OMS), l'utilisation récente de données génomiques a conduit au développement de nouveaux schémas de classification moléculaire pour le CG.

Récemment, les technologies de séquençage de nouvelle génération (NGS) (next-generation sequencing) ont fait une révolution dans l'étude de la génomique et la biologie moléculaire et ils sont de plus en plus utilisées pour étudier tous les types de cancer y compris le cancer de l'estomac (Oodwin et al., 2016 ; Sarda et Hannenhalli., 2014).

Le Réseau de recherche du « The Cancer Genome Atlas » (TCGA) a réalisé une large étude sur 295 individus atteints de CG provenant de plusieurs pays. Dans cette analyse les technologies NGS ont été utilisées afin de mieux caractériser la génomique du CG.

L'étude a permis de développer une classification moléculaire robuste du CG et à identifier de nouvelles mutations dans les différentes classes de ce type de cancer. Cette classification a permis d'explorer de nouveaux horizons de la recherche thérapeutique.

Les quatre sous-types moléculaires proposés par TCGA sont: les CG associés à l'EBV, les CG présentant une instabilité des microsatellites, les CG présentant une stabilité

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

génomique et les CG présentant une instabilité chromosomique (Cancer Genome Atlas Research Network., 2014).

Le résumé des principales altérations génétiques détectées dans les différentes classes du CG sont fourni dans le tableau suivant.

Tableau 2.4: Principales caractéristiques génomiques des quatre classes moléculaires du cancer gastrique proposées par TCGA, d'après (Gulley., 2015).

Les cancers gastriques associés à l'EBV (9% des CG) : - Mutation de PIK3CA - Importante hyperméthylation de l'ADN y compris dans CDKN2A (p16) mais non pas dans le promoteur MLH1 - Amplification du gène JAK2 - Dérégulation des gènes impliqués dans la réponse immunitaire avec CD274 et PDCD1LG2 (PD-L1 et PD-L2) amplification et surexpression
Les cancers gastriques présentant une instabilité des microsatellites (22% des CG) : - Hyperméthylation d'ADN avec une inhibition épigénétiques de MLH1 - Mutation de nombreux gènes incluant les facteurs HLA de classe 1 affectant la présentation de l'antigène.
Les cancers gastriques présentant une stabilité génomique (20% des CG) : - Mutations activatrice de GTPase unique (RHOA ou ARHGAP) - Mutation de CDH1 (E-cadhérine) (somatique) - Sous-type histologique diffus
Les cancers gastriques présentant une instabilité chromosomique (50% des CG) : - Plusieurs amplifications et délétions de gènes, notamment l'EGFR, le VEGFA et d'autres amplificateurs génétiques du récepteur tyrosine kinase, ou amplification des gènes régulateur du cycle cellulaire (CCND1, CCNE1, CDK6) - Mutation TP53

2.1.5. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque ont été identifiés pour le cancer de l'estomac ; ils incluent : l'infection par *Helicobacter pylori*, le régime alimentaire, le mode de vie (tabagisme et consommation d'alcool), l'obésité, les radiations, l'infection par l'EBV, les antécédents de gastrectomie partielle et les antécédents familiaux.

a. Infections par *Helicobacter pylori*

H. pylori, bactérie à Gram négatif, est caractérisée comme cancérogène de classe I pour le CG par l'OMS depuis 1994 (Schistosomes., 1994). Cette bactérie colonise la muqueuse gastrique de 50% de la population humaine. De nombreuses études épidémiologiques ont

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

montré que l'infection par *H. pylori* est le principal facteur de risque du CG. Ainsi, l'éradication de l'infection pourrait avoir un rôle protecteur (Asaka et al., 1997 ; de Vries et al., 2007 ; de Martel et al., 2012 ; Ishaq et Nunn, 2015).

Le pouvoir pathogène de *H. pylori* est variable et dépend de différents mécanismes qui ne sont pas encore complètement caractérisés. Principalement, *H. pylori* peut conduire au développement d'un CG selon deux mécanismes :

(i) Un effet indirect par des processus inflammatoires : l'infection par *H. pylori* provoque une réponse inflammatoire chronique entraînant un renouvellement cellulaire accru qui, au cours de plusieurs décennies, peut entraîner une accumulation d'erreurs mitotiques. La progression de ce processus inflammatoire a été illustrée dans la cascade de Correa décrite précédemment.

(ii) Un effet direct sur les cellules épithéliales gastriques : l'infection par *H. pylori* peut avoir des effets directs sur la composition moléculaire des cellules épithéliales gastriques, suite à l'action toxique des facteurs de virulence. *H. pylori* présente une grande diversité génétique, avec notamment plusieurs souches possédant des gènes associés à l'expression de cytotoxines comme la cytotoxine associée au gène A (*cytotoxin-associated gene A*, CagA), et la cytotoxine vacuolante A (*vacuolating cytotoxin A*, VacA). Ces substances sont des facteurs de virulence associés aux lésions gastriques précancéreuses comme la gastrite atrophique et la dysplasie (Niwa et al., 2010).

Des études menées chez la souris ont montré une augmentation du taux de mutation dans la muqueuse gastrique infectée par *H. pylori* (Touati et al., 2003). Les souches virulentes de cette bactérie peuvent ainsi provoquer des mutations des gènes régulateurs du cycle cellulaire, des carences dans les mécanismes de réparation de l'ADN, une perte des propriétés adhésives des cellules, ainsi que des changements épigénétiques.

Toutes ces transformations sont capables de modifier le comportement de la cellule, ce qui peut conduire à l'autonomie cellulaire et à la transformation maligne (Coelho et al., 2016 ; Peek, 2016 ; Chen et al., 2016(a) ; Ishaq et al., 2016 ; Naumann et al., 2017).

b. Facteurs alimentaires

Indépendamment de l'infection par *H. pylori*, le mode alimentaire semble être un facteur de risque pour le CG. Le Fonds Mondial de Recherche contre le Cancer (FMRC) et l'Institut Américain de Recherche sur le Cancer (AICR) estiment que le sel et les aliments salés, ainsi que les viandes ou poissons fumés, transformés ou grillés favorisent l'apparition du CG (Wiseman, 2008). Des études épidémiologiques ont confirmé que la consommation

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

d'aliments riches en sel était associée à un risque élevé de développer un cancer de l'estomac (Woo et al., 2014 ; Fang et al., 2015 ; Shin et al., 2016). En revanche, la réduction de la consommation d'aliments salés, remplacés par une alimentation conservée par réfrigération, a été corrélée à une réduction des taux du cancer de l'estomac (La Vecchia et al., 1990 ; Boeing et Frentzel-Beyme, 1991). D'autre part, la consommation de légumes et de fruits diminuerait le risque de CG de 40% par leurs effets antioxydants (Kobayashi et al., 2002 ; Cheng et al., 2016(a) ; Wang et al., 2017).

D'un autre côté, un apport alimentaire élevé en sel augmente également le risque d'infection par *H. pylori*, et sa capacité à promouvoir le développement du CG (Fox et al., 1999 ; Loh et al., 2007). Des études menées chez la souris ont révélé qu'un régime riche en sel provoque une hyperplasie gastrique et améliore la colonisation par *H. pylori* (Fox et al., 1999). Ce régime salé induit également une dysplasie de haut grade et un adénocarcinome gastrique invasif chez des gerbilles infectées par *H. pylori* (Wang et al., 2000 ; Kato et al., 2006 ; Gaddy et al., 2013).

En effet, les concentrations élevées en sel stimulent l'expression accrue de l'oncoprotéine CagA, qui entraînerait une inflammation de l'épithélium gastrique et une hypochlorhydrie, favorisant la formation de tumeurs gastriques (Loh et al., 2012). D'après une hypothèse alternative, les concentrations élevées en sel pourraient conduire à une modification de l'expression de multiples gènes d'*H. pylori* (y compris *CagA*) ainsi qu'à des altérations dans les cellules hôtes. Ces facteurs pourraient stimuler une carcinogenèse développée (Lee et al., 2003; Krejs, 2010).

Les agents cancérigènes alimentaires peuvent également interagir directement avec les cellules épithéliales gastriques et provoquer des mutations génétiques. Un taux élevé de chlorure de sodium peut endommager la muqueuse gastrique, provoquer la mort cellulaire, et induire la prolifération de cellules régénératives dans les modèles animaux (Cohen et Roe, 1997).

Les composés N-nitrosés ont des effets carcinogènes; l'exposition à ces composés, qu'elle soit alimentaire ou endogène, peut augmenter significativement le risque du cancer gastro-intestinal (Jakszyn et al., 2006; Loh et al., 2011). Les composés N-nitrosés peuvent être obtenus par la nitrosation de nitrates et de nitrites provenant de certains aliments comme les viandes fumées, cuites au barbecue ou grillées, traitées ou transformées, le poisson salé ou fumé, les légumes séchés ou les condiments conservés dans le vinaigre (Xu et al., 2015). Ainsi, le Calcium, la vitamine A et C ont été postulé d'exercer un rôle protecteur de la

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

muqueuse gastrique par la réduction de la formation des composés N-nitrosé carcinogènes (Haungs et al., 2000).

Une récente étude a révélé qu'une alimentation riche en graisses stimule les changements précancéreux de la muqueuse gastrique par l'activation de la voie de signalisation du récepteur de la leptine (Arita et al., 2016).

Il est intéressant ici de mentionner qu'il existe une corrélation entre le régime alimentaire méditerranéen et d'une part un risque réduit de plusieurs types de cancer, et d'autre part la mortalité globale par cancer, y compris le cancer de l'estomac (Schwingshackl et Hoffmann, 2016).

c. Facteurs héréditaires et génétiques

La plupart des CG sont sporadiques, sans antécédents familiaux ou agrégations de cas. Seuls 1 à 3 % des CG peuvent être attribués à des formes héréditaires (Jolissaint et al., 2011). Des altérations génétiques dans les CG sporadiques sont fréquemment rapportées.

Les trois régions chromosomiques le plus souvent en cause correspondent à 17q, 20q et 1q (42 % à 53 %). Les différents types histologiques du CG ont des profils relativement différents sans qu'il existe de gain ou de perte typiques (Sunakawa et Lenz, 2015). La classification de TCGA englobe toutes les caractéristiques génomiques des différents types de CG.

➤ La forme familiale des cancers gastriques

La forme familiale est observée dans près 10 % des CG. Elle est le reflet d'une augmentation intrafamiliale des facteurs de risque, qui peut résulter de l'interaction entre les facteurs génétiques de susceptibilité et certains facteurs environnementaux, comme la consommation d'alcool, le tabagisme ou l'alimentation. Les facteurs génétiques peuvent affecter les réponses immunitaires et inflammatoires, en particuliers lors d'une infection par *H. pylori* (Jolissaint et al., 2011 ; Cheng et al., 2016).

Des polymorphismes fonctionnels dans les gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires produites en réponse à l'infection par *H. pylori*, telles que les interleukines 1 β , 8 et 10 (IL-1 β , IL-8, IL-10) ou le *Tumor Necrosis Factor* (TNF α) seraient également associés à une amplification de la réponse inflammatoire et à une majoration du risque de CG (Kamangar et al., 2006).

De même, des polymorphismes dans les gènes impliqués dans l'immunité innée pourraient interférer avec l'inflammation induite et le risque de CG. Ceci a notamment été montré pour certains polymorphismes du gène *TLR4*, qui code pour le récepteur *Toll-like*

receptor 4, récepteur du liposaccharide de la paroi bactérienne (van der Ploeg et al., 2015 ; de Oliveira et al., 2015 ; Liu et al., 2015 ; Ying et al., 2016). Ces études d'associations à l'échelle du génome ont principalement été effectuées dans des populations chinoises, coréennes et japonaises, où le taux de CG est très élevé.

➤ **La forme héréditaire des cancers gastriques:**

1 à 3 % des CG sont d'origine héréditaire. Ces CG sont par définition des cancers familiaux hérités de façon autosomique dominante. Il en existe deux types : les CG de type diffus héréditaires ou (*Hereditary Diffuse Gastric Carcinoma* (HDGC)), et les CG survenant dans le cadre de maladies héréditaires.

- **Les cancers gastriques de type diffus héréditaires**

Ils se caractérisent par un aspect histologique diffus, peu différencié, et à cellules indépendantes dans tous les cas (Colvin et al., 2015). Les HDGC sont généralement liés à une mutation du gène *CDH1* ou à une hyperméthylation de son promoteur. Ce gène code pour la protéine E-cadhérine, une protéine transmembranaire impliquée dans plusieurs phénomènes comme l'adhésion intercellulaire, le contrôle de la morphogénèse, le trafic intracellulaire et la prolifération cellulaire.

La mutation de ce gène induit une perte des fonctions de l'E-cadhérine, perturbant ainsi l'adhésion intercellulaire, ce qui explique l'aspect diffus à cellules isolées de ces cancers. Le gène *CDH1* est le seul gène connu causal pour les HDGC, et est impliqué dans 40 % des cas, ce qui signifie que 60 % des cas relèvent d'un diagnostic génétique encore inconnu (Petrovchich et Ford, 2016 ; Tu et al., 2016).

- **Les cancers gastriques survenant dans le cadre de maladies héréditaires**

Dans cette catégorie, le cancer de l'estomac n'est pas la pathologie la plus fréquente ; il n'est qu'une des localisations possibles de la maladie néoplasique (Sezeur et al., 2006).

- Plusieurs polyposes digestives sont décrites : la polypose adénomateuse familiale (PAF), est causée par une mutation du gène de la polypose adénomateuse colique (*APC*). Le syndrome de Peutz-Jeghers est associé à une mutation du gène *STK11*. Le syndrome de polypose juvénile engendre la formation de polypes dans le tube digestif, dont l'estomac. Ces polypes apparaissent habituellement avant l'âge de 20 ans.

- Le syndrome de Lynch (aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose, ou HNPCC) est causé par la mutation de gènes qui interviennent dans la réparation d'erreurs lors de la réplication de l'ADN.

- Le syndrome de Li-Fraumeni est habituellement causé par une mutation du gène *TP53* ou du gène *CHEK2*. Il est lié à une hausse du risque d'apparition de plusieurs types de cancers, dont le cancer de l'estomac.

d. Facteurs liés aux habitudes de vie, à la consommation d'alcool et au tabagisme

Parmi les facteurs environnementaux, de nombreuses habitudes de vie jouent un rôle important dans le développement du CG. En 2010, l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*) a annoncé qu'il existait une association significative entre le tabagisme et le risque d'apparition du CG (IARC, 2010). En effet, le tabagisme majore le risque du CG directement, en agissant sur l'épithélium gastrique, et indirectement, en favorisant l'infection par *H. pylori*. Ce risque augmente avec l'intensité et la durée de la consommation de tabac (Yeh et al., 2009 ; Yeh et al., 2013). Ainsi, environ 18 % des CG peuvent être attribués au tabagisme (Sjödahl et al., 2007).

La consommation d'alcool augmente également le risque de CG (Yeh et al., 2011 ; Bagnardi et al., 2015). Une étude a démontré qu'une consommation de tabac élevée (> 20 cigarettes/jour), associée à une consommation d'alcool régulière (> 5 occasions/14 jours) peut majorer le risque de CG non-cardia d'environ 5 fois par rapport au risque encouru par les non-consommateurs.

D'autres facteurs de risque, tels que l'exposition aux rayonnements, l'âge, le sexe masculin, le manque d'activité physique, et le faible statut socioéconomique, ont également été associés à un risque accru de CG non-cardia, alors que le reflux gastro-oesophagien et l'obésité ont été spécifiquement liés à un risque accru de CG touchant le cardia (Karimi et al., 2014).

e. Conditions pathologiques et lésions précancéreuses

Un certain nombre de situations ou de lésions gastriques s'accompagnent d'une augmentation du risque de CG. Les principales conditions précancéreuses à l'origine des CG sont: la gastrite chronique atrophique avec métaplasie intestinale, l'ulcère gastrique et la gastrectomie pareille. Moins de 10 % des gastrites chroniques atrophiques évoluent en CG. Ainsi, les malades atteints d'un ulcère gastrique ont un risque de développer un cancer de l'estomac 1.5 à 2 fois plus élevé par rapport aux sujets sains. La maladie de Biermer (gastrite atrophique fundique auto-immune) peut aussi favoriser la survenue de tumeurs endocrines gastriques. De même, le risque d'adénocarcinome sur moignon gastrique après gastrectomie partielle est significativement très élevé dans les 15 à 20 ans suivant la première chirurgie (Yakirevich et Resnick., 2013).

f. Infection par le virus d'Epstein-Barr

L'infection par l'EBV est également un facteur de risque pour le CG. Les caractéristiques épidémiologiques, clinico-pathologiques et moléculaires des CGaEBV, ainsi que le rôle de l'EBV dans le CG, sont détaillés dans la partie suivante.

2.2. Cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr

2.2.1. Définition

En 1990, en utilisant la technique de PCR, Burke et ses collaborateurs détectent pour la première fois le génome de l'EBV dans une forme rare du CG qui ressemble beaucoup au cancer indifférencié du nasopharynx : le carcinome indifférencié à stroma lymphoïde (Lymphoepithelioma-like carcinoma (LELC) (Burke et al., 1990). L'introduction de la technique d'hybridation in situ a facilité la détection des EBERs au début des années 90, et a permis de révéler une forte association entre l'EBV et le sous-type LELC, avec une corrélation pouvant s'élever à 90 %.

De plus, en 1992, Shibata et Weiss ont pu déterminer que l'EBV est impliqué non seulement dans le LELC, mais également dans tous les carcinomes gastriques ordinaires (Shibata et Weiss., 1992)

Au cours de la dernière décennie, le rôle étiologique de l'EBV dans la carcinogenèse gastrique est devenu apparent. Ainsi, selon Thorley-Lawson (2005), la présence uniforme des EBERs dans les cellules tumorales, et leur absence dans les cellules épithéliales normales, ainsi que la détection de l'épisome viral monoclonal dans les cellules tumorales, sont deux preuves suffisantes pour démontrer un lien de causalité entre l'EBV et le CG.

D'autres observations supplémentaires, telles que la présence de forts titres d'anticorps anti-EBV dans le sérum des patients (Levine et al., 1995) et les caractéristiques morphologiques et épigénétiques uniques observées dans ce type de cancer (Fukayama et Ushiku, 2011 ; Kaneda et al., 2012 ; Matsusaka et al., 2014) supportent l'implication étiologique de l'EBV dans le CG. Plus récemment, des études moléculaires exhaustives ont démontré que les CGaEBV présentent des anomalies moléculaires caractéristiques différentes de celles observées dans les CG EBV-négatifs (*Cancer Genome Atlas Research Network*, 2014 ; Wang et al., 2014).

Le CGaEBV se définit par la croissance clonale de cellules épithéliales de l'estomac infectées par l'EBV. Les CGaEBV peuvent être identifiés par hybridation in situ (ISH) des EBERs sur des sections de carcinomes gastriques fixés au formol et enrobés dans la paraffine (Fukayama., 2010). Cette méthode est basée sur le fait que les EBERs sont abondamment

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

produits dans le noyau des cellules infectées (10^{6-7} copies par cellule). Ainsi, dans les cas de CGaEBV, l'ISH permet de détecter les EBERs dans la quasi-totalité des cellules cancéreuses, tandis que les cellules épithéliales gastriques non néoplasiques adjacentes sont négatives pour ce test (Tokunaga et al., 1993). Ainsi, la détection des EBERs par ISH est considérée comme la méthode de référence pour le dépistage du CGaEBV.

2.2.2. Caractéristiques épidémiologiques du cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr

La fréquence de l'infection par l'EBV dans le CG varie de 2 à 20 %, avec une moyenne de 10 %. Au niveau mondial, 90 000 de nouveaux patients développant ce type de cancer chaque année (Iizasa et al., 2012). Contrairement au lymphome de Burkitt et au cancer du nasopharynx qui ont une distribution endémique en Afrique équatoriale et en Asie du sud-Est respectivement, le CGaEBV forme le plus large groupe de tumeur maligne associée à l'EBV dans le monde, et sa distribution présente des variations géographiques importantes. Son incidence est élevée dans certains pays occidentaux comme l'Allemagne et les États-Unis, alors qu'elle est plus faible dans la plupart des pays européens, en Amérique du Sud et en Asie (Camargo et al., 2011 ; Iizasa et al., 2012).

D'après la charge mondiale de mortalité de 2010, les taux de mortalité annuelle estimés pour les pathologies malignes liées à l'EBV sont de 69 081 cas de carcinomes gastriques liés à l'EBV, 63 118 cas de carcinomes nasopharyngés, 7917 cas de lymphomes de Hodgkin et 2251 cas de lymphomes de Burkitt (Khan et Hashim, 2014).

Une étude japonaise effectuée par Tokunaga et ses collaborateurs (1993) a étudié la prévalence des CGaEBV dans plusieurs pays. L'étude a révélé que cette fréquence est inversement proportionnelle à l'incidence du CG. En effet, les pays à faible taux de CG présentent une fréquence élevée de CGaEBV, tel qu'il a été observé aux États-Unis et en Allemagne. Par contre, les pays à haut risque de CG, tels que le Japon et la Chine, présentent une faible incidence de CGaEBV. Par ailleurs, certaines études suggèrent que les conditions économiques ne sont pas une variable pertinente pour expliquer la fréquence des tumeurs gastriques associées à l'EBV, car il n'existe pas de corrélation entre la fréquence d'apparition des CGaEBV et le niveau de développement du pays (Gulley, al. 1997 ; Lee et al., 2009(a)).

2.2.3. Caractéristiques clinico-pathologiques du cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr

Le CGaEBV forme un sous-groupe distinct des autres types de CG par ses caractéristiques clinico-pathologiques. Selon la plus importante méta-analyse effectuée à ce jour, incluant 15 952 cas provenant de différents pays (Murphy et al., 2009), les caractéristiques cliniques du CGaEBV sont:

- une prédominance masculine,
- une localisation principale dans la partie non-antrale (cardia ou corps),
- une prédominance au sein des CG survenant après une gastrectomie partielle suite à un ulcère ou carcinome gastrique, ce type de cancer étant quatre fois plus susceptible d'être EBV-positif que d'autres formes de CG,
- une prédominance pour le type histologique LELC, la fréquence d'association de ces tumeurs à l'EBV étant quatre fois supérieure à celle rapportée pour d'autres types de CG.

Concernant le type histologique intestinal et diffus, cette étude démontre qu'il n'existe pas de préférence pour les CGaEBV, même si d'autres analyses suggèrent que les CGaEBV de type diffus dominant ceux de type intestinal (Alipov et al., 2005 ; Abdirad et al., 2007).

Certaines études détectent une association entre l'âge des patients et la survenue de la maladie (Herrera-Goepfert et al., 2005 ; BenAyed-Gourfali et al., 2011), mais les méta-analyses n'ont pas confirmé cette observation.

La tomodensitométrie permet d'observer que le CGaEBV est souvent d'aspect ulcéré, avec un épaissement marqué de la paroi gastrique (Fukayama, 2010 ; Maeda et al., 2010).

A son stade précoce, le CGaEBV présente une histologie caractéristique appelée « motif en dentelle » (figure 2.18). Ce type de structure est typiquement observée dans les lésions intra-muqueuses montrant des tubules et des cordons anastomosés irréguliers, et associées à une infiltration lymphocytaire modérée à dense, ce qui donne un aspect de motif en dentelle ou réticulaire à faible grossissement. Lorsque ce motif est observé dans les échantillons de biopsie, le dépistage d'EBERs par ISH est recommandé pour le diagnostic (Arikawa et al., 1997 ; Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)).

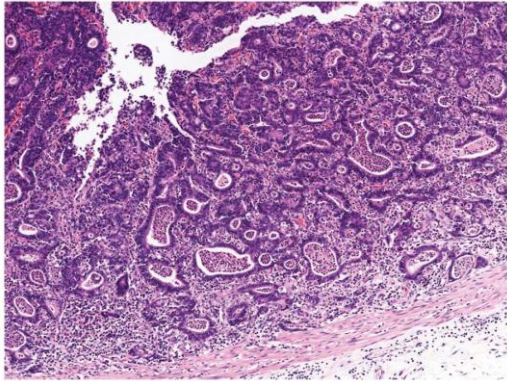


Figure 2.18 : Modèle de dentelle caractéristique du CGaEBV de stade précoce d'après (Shinozaki-Ushiku et al., 2015 (a)).

Les CGaEBV sont généralement associés à une gastrite atrophique caractérisée par l'infiltration d'un nombre élevé de lymphocytes. La gastrite chronique peut alors augmenter les chances d'interaction entre les cellules épithéliales gastriques et les lymphocytes B ; les cytokines produites par les cellules inflammatoires peuvent ainsi soutenir la croissance des cellules épithéliales gastriques infectées par l'EBV (Choi et al., 2012).

Certaines méta-analyses ont déterminé que les tumeurs gastriques EBV-positives sont inversement corrélées avec le paramètre TNM, ce qui signifie que le CGaEBV montre un faible taux d'atteinte ganglionnaire par rapport à d'autres types de CG (Camargo et al., 2011 ; Abe et al., 2015). Par ailleurs, il n'existe pas de consensus sur l'impact pronostique de l'infection par l'EBV sur le carcinome gastrique. Cependant, une récente méta-analyse de 4599 cas de carcinomes gastriques a démontré que la présence d'une infection par l'EBV est associée à une réduction du taux de mortalité (Camargo et al., 2014).

L'influence d'*H. pylori* sur l'émergence du CGaEBV est controversée. Certains rapports indiquent que l'infection par *H. pylori* est moins fréquente dans les CGaEBV (Wu et al., 2000 ; Luo et al., 2006), alors que d'autres démontrent que cette fréquence est plus élevée dans les CGaEBV par rapport à d'autres types de CG (Yanai et al., 1999 ; Lima et al., 2008).

Par ailleurs, les CGaEBV sont fréquemment localisés près de la frontière d'une muqueuse atrophique, où l'infiltration de cellules inflammatoires est abondante (Yanai et al., 1999 ; Kaizaki et al., 1999).

Enfin, il a été démontré que les facteurs environnementales et le mode de vie ont un effet sur la survenue des CGaEBV, l'analyse récente d'une large série de patients atteints de CGaEBV a démontré que le tabagisme est un facteur de risque pour cette pathologie (Camargo et al., 2014) ; ainsi, deux études confirment qu'une alimentation riche en sel

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

présente également un facteur de risque pour ce type de cancer (Koriyama et al., 2005 ; Campos et al., 2006).

Ces remarquables différences épidémiologiques et cliniques suggèrent la présence d'importantes différences dans l'étiologie et les étapes de la carcinogenèse entre le CG EBV-positif et le CG EBV-négatif.

2.2.4. Oncogenèse induite par le virus d'Epstein-Barr dans les cellules épithéliales gastriques

2.2.4.1. Intégration virale

L'étape initiale de l'oncogenèse gastrique induite par l'EBV est l'infection des cellules épithéliales. Le mécanisme d'entrée du virus dans les cellules épithéliales est mal connu. Il est cependant clair que ce mécanisme est non seulement différent de celui de l'entrée de l'EBV dans les lymphocytes B, mais aussi probablement beaucoup plus complexe, en raison de l'absence du récepteur CD21 des glycoprotéines virale gp350/gp220 à la surface des cellules épithéliales. De plus le complexe d'histocompatibilité HLA de classe II intervient dans l'entrée de l'EBV est absent dans les cellules épithéliales (Imai et al., 1998). Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'entrée du virus, ils ont été détaillés dans le chapitre 2.

Une infection *in vitro* de cellules épithéliales gastriques humaines par l'EBV a été réalisée pour la première fois à la fin des années 90 (Yoshiyama et al., 1997), en utilisant une souche d'EBV recombinante possédant un gène de résistance à la néomycine (Yoshiyama et al., 1995 ; Shimizu et al., 1996). Les cellules épithéliales, n'exprimant pas le récepteur CD21, ont pu être infectées par l'EBV sans que cette infection ne soit bloquée par un anticorps monoclonal anti-CD21. Les chercheurs ont ainsi pu conclure que les cellules tumorales gastriques étaient sensibles à l'infection par l'EBV et qu'un nouveau récepteur, différent du CD21, était impliqué.

Par la suite, Imai et ses collaborateurs (1998) ont réalisé un transfert d'EBV dans des cellules épithéliales après le mélange de cellules épithéliales avec des cellules B recombinantes produisant l'EBV. Ils ont alors constaté que le transfert s'effectuait par contact cellule à cellule et que l'infection par l'EBV de la lignée cellulaire de carcinome gastrique Akata était établie avec une efficacité environ 800 fois plus élevée par contact cellule à cellule comparée à l'incubation directe avec des particules virale. Chesnokova et Hutt-Fletcher (2014) ajoutent qu'un virus libéré des cellules B est 5 fois plus infectieux pour les cellules épithéliales que pour les cellules B.

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

Par ailleurs, Akiba et ses collaborateurs (2008) supposent que l'infection des cellules épithéliales gastrique par l'EBV est favorisée par la présence de lésions au niveau de la muqueuse gastrique. En effet, il a été montré que les patients atteints de GCaEBV sont fréquemment exposés à la poussière de bois et à la poussière de métaux, qui provoquent des lésions au niveau de l'estomac (Tokunaga et al., 1993). De même, une forte prévalence de signaux EBERs (jusqu'à 30 %) a été observée dans les cancers du moignon gastrique, qui sont par définition des cancers survenant après une gastrectomie partielle (Chang et al., 2000 ; Zur Hausen et al., 2004).

Ainsi, l'EBV peut infecter l'épithélium de l'estomac par l'intermédiaire des lymphocytes B porteurs d'EBV réactivés et recrutés sur la membrane endommagée, ou sur la muqueuse gastrique régénératrice suite à une réaction inflammatoire. Lorsque l'infection des cellules épithéliales est établie, le virus adopte alors certaines stratégies pour assurer sa survie.

2.2.4.2. Maintien de l'ADN clonal dans le cancer gastrique associé au virus d'Epstein-Barr

L'ADN des particules virales, bicaténaire et linéaire, devient circulaire dans les cellules infectées. La circularisation se fait par fusion de séquences terminales répétées (TR) des deux extrémités de l'ADN. Lorsqu'une cellule infectée subit une transformation maligne, la même structure de répétition terminale fusionnée est héritée par toute la descendance du clone malin. L'analyse des TR par Southern blot est un outil essentiel pour la détermination de la clonalité, de l'intégration et de l'état d'activation de l'EBV dans les cellules infectées.

Un seul fragment d'enzyme de restriction terminal indique que l'infection par l'EBV est monoclonale, provenant d'une seule cellule infectée, alors que la présence de deux fragments indique que le génome de l'EBV est polyclonal, et que l'infection peut provenir de multiples cellules (Figure 2.19) (Bánáti et al., 2017).

Dans le CGaEBV, l'analyse des TR par Southern blot a démontré que, dans chaque échantillon, il existe un fragment unique de 6 kb. Ceci indique que la prolifération de l'EBV est monoclonale, que le génome viral est présent sous forme d'épisome, sans intégration dans le génome d'hôte, et que l'infection est latente, sans réplication virale.

Lorsque cette analyse a été appliquée aux carcinomes intra-muqueux (tumeur de stade précoce) et aux carcinomes invasifs (stade avancé), l'EBV s'est révélé être monoclonal ou bi-clonal dans les tissus du carcinome au stade précoce, mais toujours monoclonal au stade avancé. Ceci indique que l'infection par l'EBV se produit au stade primaire ou très précoce du développement du carcinome gastrique (Fukayama et al., 2008 ; Abe et al., 2015).

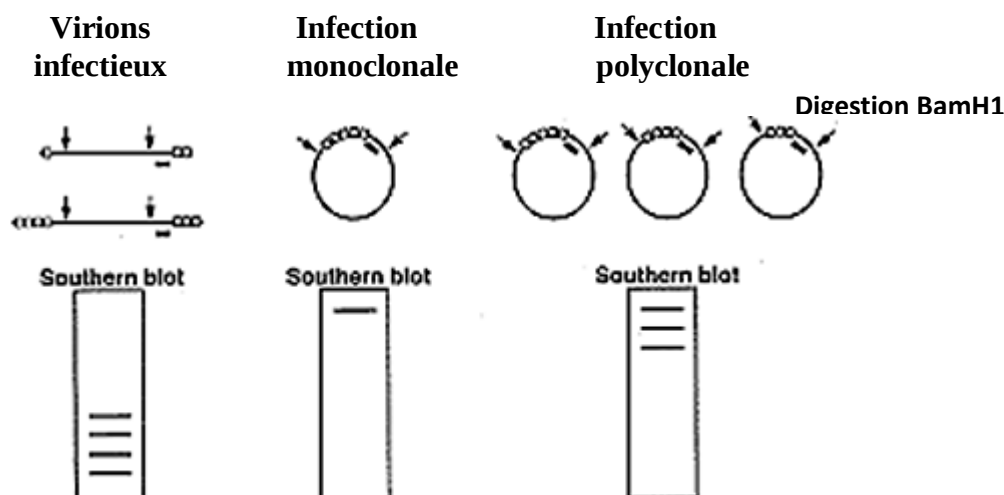


Figure 2.19 : Détection de l'infection monoclonale et polyclonale de l'EBV dans le cancer gastrique. L'analyse par Southern blot révèle que les virions infectieux produisent une série de petites bandes. En revanche, une tumeur monoclonale présente une seule bande de haut poids moléculaire, et une tumeur polyclonale présente plusieurs bandes. D'après (Gulley., 2001).

Les premières étapes du développement du CGaEBV ne sont pas encore parfaitement élucidées. En effet, une ou plusieurs cellules infectées dans la muqueuse de l'estomac, contenant des copies de l'ADN viral, se transforment et commencent la croissance clonale.

La protéine nucléaire virale EBNA-1 est une protéine multifonctionnelle nécessaire pour maintenir une infection dans les cellules hôtes, et ce en contribuant à la réplication et à la ségrégation mitotique du génome de l'EBV. EBNA-1 recrute un complexe cellulaire de reconnaissance de l'origine OriP, nécessaire pour la réplication de l'ADN viral.

En utilisant la machinerie cellulaire, la réplication virale est initiée pendant la phase S de la division des cellules hôte. EBNA-1 assure la liaison des épisomes viraux aux chromosomes de l'hôte et donc la propagation du même nombre de copies du génome viral aux cellules filles (Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)).

2.2.4.3. Interactions du virus d'Epstein-Barr et de l'hôte au niveau moléculaire

a. Rôles des gènes de latence

L'expression des gènes de latence et le type de latence dans les CGaEBV est un sujet de controverse. Dans Une large méta-analyse de 25 publication concernant l'expression des gènes de latence de l'EBV dans le CG suggère que le modèle de transcription des gènes de latence dans le CGaEBV est unique, et ne correspond pas aux modèles de latence standards de l'EBV (Ribeiro et al., 2017). Ici, l'analyse a révélé que dans le cas des CGaEBV, la

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

fréquence d'expression des EBERs est de 100 %, celle d'EBNA-1 est de 98,1 %, et celle de LMP-2A de 53,8 %, alors que LMP-1 et LMP-2B sont présents dans seulement 10 % des cas. Par ailleurs, la transcription des gènes lytiques précoces immédiats, BZLF1 et BRLF1, a parfois été détectée sans progression ultérieure du cycle lytique.

Toutefois, selon l'étude faite par (Cancer Genome Atlas Research Network., 2014) ainsi que d'autres travaux comme (Imai et al., 1994 ; Luo et al., 2005 ; Young et al., 2003) le CGaEBV est un néoplasme de latence I ou II dans lesquelles EBNA-1, EBERs, BART, miARN BART et parfois (40%) de la protéine LMP2A sont exprimés. selon ces auteurs l'absence d'expression d'EBNA-2 et LMP-1 qui sont importants pour l'immortalisation et la transformation des cellules B est dû à la présence des anomalies dans les cellules épithéliales gastriques qui ont empêcher l'expression de ces protéines.

Pour déterminer les propriétés oncogènes des gènes latents autres que la LMP-1, les rôles des gènes latents exprimés dans le CG ont été étudiés. Ces résultats sont discutés séparément dans les sections suivantes et résumé dans le (Tableau 2.5).

- **EBERs**

L'infection par l'EBV induit l'expression du facteur de croissance autocrine IGF-1 (*insulin-like growth factor-1*) dans la lignée cellulaire gastrique NUGC-3. Il a été démontré que les EBERs sont responsables de cette induction. (Iwakiri et al., 2003). D'autre part, EBER-1 modifie l'expression des micro-ARN cellulaires qui altèrent l'expression de la cadhérine-E, entraînant ainsi une transition épithéliale-mésenchymateuse dans une lignée cellulaire de carcinome gastrique (Shinozaki et al., 2010), cette effet intervient dans la chimiorésistance. De plus, une étude a montré que les EBERs stimulent l'expression de IL-6 et active son régulateur STAT3, ce qui entraîne une régulation négative des inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et p27 dans une lignée cellulaire de carcinome gastrique (Banerjee et al., 2013). Cette même étude a également démontré que les EBERs induisent l'activation des molécules pro-métastatiques pFAK et pPAK1, ainsi que la régulation négative des molécules anti-métastatiques RhoGD1 et KAI-1, favorisant ainsi la migration cellulaire.

- **EBNA-1**

Les lignées cellulaires gastriques SCM1 et TMC1 transfectées par EBNA-1 présentent des propriétés tumorigènes et des taux de croissance accrus dans les xénogreffes (Cheng et al., 2010). Dans les lignées cellulaires gastrique AGS infectées par l'EBV, la protéine PML (Promyelocytic leukemia protein) est présente en faible quantité par rapport aux lignées de cellules EBV-négatives. Une observation similaire a été effectuée dans des échantillons de

biopsie. Cette diminution de l'expression de PML est contrôlée par EBNA-1. De fait, PML est une protéine suppresseur de tumeur associée à la formation des corps nucléaire liés à la chromatine PML-NBs (promyelocytic leukemia nuclear bodies). Les PML-NBs sont connus pour avoir un certain nombre de fonctions cellulaires régulatrices, avec un rôle dans l'apoptose, la stabilité du génome, les effets antiviraux et le contrôle de la division cellulaire. Dans les lignées AGS, EBNA-1 diminue l'expression de PML et empêche donc l'activation de p53 et le déclenchement de l'apoptose en réponse aux lésions de l'ADN, entraînant ainsi une survie cellulaire (Sivachandran et al., 2012).

- **LMP-2A**

De nombreuses études ont permis de précisément révéler les rôles de LMP-2A au cours de la carcinogenèse gastrique. Ainsi, il a été observé qu'une lignée cellulaire gastrique transfectée par LMP-2A présentait une résistance contre l'apoptose. Cette étude a permis de déterminer que LMP-2A activait l'expression de la survivin par l'intermédiaire de l'activation du facteur nucléaire NF- κ B (Hino et al., 2008). De manière similaire, la transfection de LMP-2A dans une lignée cellulaire de carcinome gastrique a amélioré la croissance cellulaire et réduit l'apoptose, ceci via l'augmentation de l'expression de la cycline E, et donc la proportion de cellules en phase S (Liu et al., 2011). Il est également possible que LMP-2A soit capable d'activer la voie de signalisation Notch, qui améliore l'expression des protéines liées à la dynamine (Drp-1), qui, à leur tour, activent la migration cellulaire (Pal et al., 2014).

En plus de ces effets modulateurs directs sur la prolifération et la migration des cellules, LMP-2A a une fonction unique, induisant des changements épigénétiques dans le génome de l'hôte. En effet, elle favorise la phosphorylation de STAT3, qui active la transcription de l'ADN méthyltransférase DNMT1 (Hino et al., 2009). L'activation de DNMT1 induit la méthylation des îlots CpG dans la région promotrice de *PTEN*, ce qui réduit son expression. L'inactivation épigénétiques du gène *PTEN* a été observée dans plusieurs types de tumeurs tels les cancers du cerveau, du poumon ou de la prostate. Les changements épigénétiques, en particulier l'hyperméthylation du génome de l'hôte, sont l'un des mécanismes les plus cruciaux lors de la carcinogenèse gastrique induite par l'EBV.

- **BARF-1**

Si plusieurs rapports suggèrent la participation de BARF-1 dans la carcinogenèse gastrique, ils se contredisent quant à sa fréquence d'expression ; BARF-1 est exprimée dans près de 100% des cas de GCaEBV pour certains (zur Hausen et al., 2000) et dans seulement 50% des cas de CGaEBV pour d'autres (Wang et al., 2004 ; Luo et al., 2005). La transfection

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

de BARF-1 dans une lignée cellulaire de carcinome gastrique induit des altérations significatives de l'expression des gènes de l'hôte, en particulier des gènes liés à la prolifération et à l'apoptose. Les cellules transfectées par BARF-1 présentent une chimiorésistance, avec un rapport d'expression de Bcl-2-Bax augmenté (Wang et al., 2006). De plus, la transfection de cellules de carcinome gastrique par BARF-1 provoque une croissance cellulaire élevée, induite par une activation de NF-kB/cycline D1, et une inhibition des régulateurs du cycle cellulaire p21WAF (Chang et al., 2013).

- **LMP-1**

La protéine LMP-1 est considérée comme le noyau du mécanisme oncogène de l'EBV, mais sa présence dans le CGaEBV est un sujet de controverse et son rôle dans la carcinogénèse gastrique est mal connu. Plusieurs rapports suggèrent que cette protéine n'est en effet pas exprimée dans les CGaEBV (Sugiura et al., 1996 ; Luo et al., 2005 ; Imai et al., 1994; Young et al., 2003). Selon ces auteurs, LMP-1 interviendrait dans les stades précoces du développement tumoral et serait par la suite réprimée selon un mécanisme inexpliqué. Ainsi, d'après Lee et al., (2011) et Tang et al., (2012) l'absence de LMP-1 peut être le résultats d'une sélection clonale des cellules tumorales LMP-1-positives par une réaction immunitaire. Les suggestions de ces auteurs se basent sur le fait que la protéine LMP-1 peut être reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques, et les patients atteints de CGaEBV conservent normalement la réponse immunitaire des cellules T spécifiques au virus. De récentes études ont observé une hyperméthylation des îlot CpG du promoteur du gène codant LMP-1, cette hyperméthylation peut être le résultats de l'extinction de l'expression de LMP-1 (Li et al., 2016).

D'autres investigations démontrent la présence de faibles taux d'expression d'ARNm correspondant à LMP-1 dans des cas de CGaEBV associé à une absence d'expression protéique (Strong et al., 2013), ces auteurs supposent que les ARNm subissent une régulation post-transcriptionnelle induisant le blocage de la traduction ou la dégradation de la protéine et que cette régulation est médiée par les miARN BART fortement exprimés dans les CGaEBV.

Toutefois d'autres études ont observé l'expression de LMP-1 dans leurs cohortes de CGaEBV par l'application des techniques de marquage immunohistologique ce qui témoigne que cette protéine joue probablement un rôle oncogène dans les CGaEBV (Shin et al., 1996 ; Harn et al., 1995).

Les rôles des différents gènes de latence virale dans la formation et le développement des CGaEBV sont résumés dans le tableau suivant.

b. Régulations épigénétiques des gènes viraux et des gènes de l'hôte

Plusieurs études ont démontré que les anomalies épigénétiques telles que l'hyperméthylation du promoteur jouent un rôle crucial dans la carcinogenèse des CGaEBV. L'EBV provoque une méthylation des îlots CpG dans les régions promotrices de nombreux gènes du virus et de l'hôte (Tempera et Lieberman, 2014). Ainsi, les CGaEBV avaient la prévalence la plus élevée de l'hyperméthylation de l'ADN comparé à d'autres types de cancers signalé par le TCGA (*Cancer Genome Atlas Research Network*, 2014).

Tableau 2.5: Rôles des gènes de latences dans le CGaEBV d'après (Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)).

Gènes de latence	Les protéines associées	Effets biologiques
EBER-1	IGF-1 hsa-miR-200a, 200b, (ZEB1, ZEB2, E-cadherin) IL-6 (STAT3, p21, p27) pFAK, pPAK1 RhoGD1 KAI-1	Croissance autocrine Transition épithéliale au mésenchyme Chimiorésistance Migration cellulaire
EBNA-1	P53 PML (p53, p21)	Tumorigénicité Anti-apoptose
LMP-2A	NF-κB (survivin) Cyclin E1 Drp-1 Notch (Drp -1) STAT3 (DMNT-1, PTEN) DMNT3b	Anti-apoptose Anti-apoptose Transition épithéliale au mésenchyme Migration cellulaire Altération épigénétique
BART et BARF-1	Bcl-2, Bax Cyclin D1 NF-κB/cyclin D1, p21WAF	Chimiorésistance Prolifération cellulaire Prolifération cellulaire

Une hyperméthylation globale et non aléatoire des îlots CpG, en particulier au niveau des promoteurs des gènes suppresseurs de tumeur, est observée dans les cas de CGaEBV. Cette hyperméthylation entraîne l'extinction de l'expression des gènes en aval. Ainsi, les cas de CGaEBV peuvent présenter une hyperméthylation des promoteurs de multiples gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (*p16INK4A*, *p14ARF*, *p15* et *p73*), dans la réparation de l'ADN (*MSH1*, *MGMT* et *GSTP1*), dans l'adhésion cellulaire et les métastases (*CDH1*, *TIMP1* et *TIMP3*), dans l'apoptose (*DAPK* et *BCL-2*) et dans la transduction du signal (*APC*, *PTEN* et *RASSF1A*) (Kang et al., 2002 ; Osawa et al., 2002 ; Zhao et al., 2013 ; Abe et al., 2015).

Si la plupart des gènes méthylés dans des CG EBV-négatifs sont également méthylés dans les CGaEBV, environ 270 gènes sont uniquement méthylés dans les CGaEBV. La méthylation de *MLH1*, fréquente (46%) dans les CG EBV-négatifs, n'a pas été détectée dans les CGaEBV (Katona et al., 2017). Dans les cellules infectées latentes, et en réponse à des agents de réactivation virale, les protéines précoces sont synthétisées, et le facteur de transcription Zta se fixe sélectivement à l'ADN méthylé des promoteurs des gènes lytiques, ce qui provoque la transition de la phase latente à la phase lytique (Chen et al., 2009).

En effet, l'expression des gènes latents viraux est également supprimée par la méthylation. Des études ont confirmé expérimentalement que la méthylation de l'ADN viral précédait la méthylation de l'ADN de l'hôte d'une semaine (Zhao et al., 2013). La méthylation des gènes viraux pourrait être un mécanisme de défense de l'hôte contre l'ADN étranger pour supprimer l'expression du gène viral. Cependant, la répression de l'expression des gènes latents viraux pourrait bénéficier à l'EBV, en lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. En outre, une méthylation excessive peut conduire à une répression des gènes suppresseurs de tumeurs, ce qui pourrait finalement donner lieu à une carcinogenèse (Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)).

Les mécanismes exacts de l'hyperméthylation induite par l'EBV, décrits ci-dessus, restent inconnus. Le rôle de LMP-2A à induire la méthylation du promoteur *PTEN* dans les lignées cellulaires de cancer gastrique infectées par l'EBV a été cité précédemment, bien que cette voie ne puisse expliquer que partiellement la méthylation globale des îlots CpG dans les CGaEBV (Hino et al., 2009).

c. Rôles des microARNs viraux

Alors que, les altérations épigénétiques induisent la régulation positive ou négative de la transcription des gènes associés au cancer, les miARNs agissent comme des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression des gènes (Nana-Sinkam et Croce., 2011). Des études ont décrit l'expression des 44 miARNs codés par l'EBV connus dans des échantillons de tissus de patients atteints de CGaEBV; les miR-BART1-3p, 2-5p, 3, 4, 5, 7, 9, 10-3p, 17-5p et 18-5p ont été exprimés à des niveaux relativement élevés. Des études ont révélé que les gènes cibles de ces miARNs avaient des fonctions associées à des voies liées au cancer, en particulier la régulation de l'apoptose. Une récente étude a montré une réduction de l'apoptose dans des lignées cellulaires gastriques et que cette réduction a été associée à une répression de la protéine Bid (un membre de la famille de bcl-2) induite par miR-BART4-5p codé par l'EBV (Shinozaki-Ushiku et al., 2015(b)).

Chapitre 2 : Le cancer gastrique associe au virus d'Epstein-Barr

Dans une autre étude, les miR-BART7-3p codé par l'EBV régule la traduction du gène suppresseur de tumeur PTEN dans les tissus du cancer du nasopharynx et favorise la transition épithéliale-mésenchymateuse et ainsi la métastase tumorale (Cai et al. 2015). Selon ces auteurs, les miR-BART7-3p qui sont abondamment exprimés dans les CGaEBV peuvent jouer le même rôle observé dans le NPC.

Il est important de noter que le rôle exacte de l'EBV dans la transformation maligne des cellules épithéliales gastrique n'est pas exactement connu. Ainsi, le stade de l'implication de ce virus dans le processus tumorigènes et les mécanismes d'actions et d'interaction entre les facteurs de latence viraux et les cellules épithéliales gastriques infectées sont en voie d'études. Abe et ses collaborateurs (2015) ont proposé un schéma hypothétique des principaux événements observés pendant la carcinogénèse induite par l'EBV dans le CG (Figure 2.20).

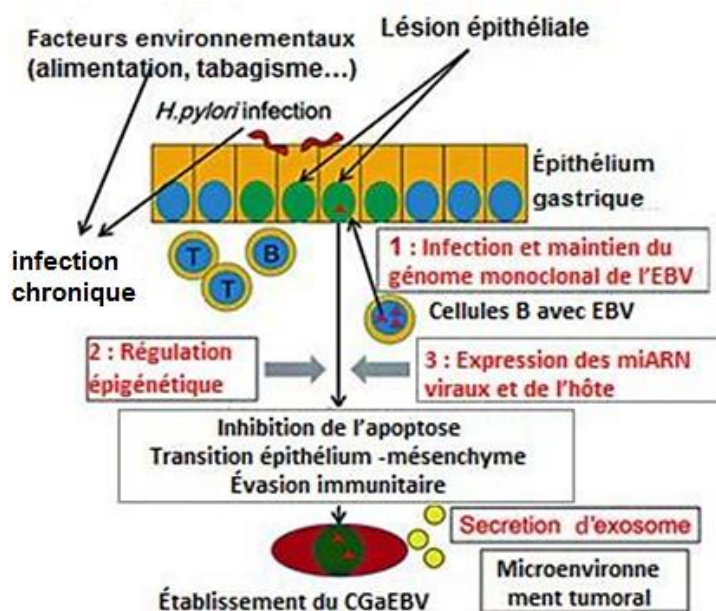


Figure 2.20: Schéma hypothétique de l'oncogenèse virale chez les CGaEBV. L'inflammation chronique induite par les facteurs environnementaux et l'infection par *H. pylori* altère la muqueuse gastrique et provoque une infiltration des lymphocytes B, y compris les cellules B infectées par l'EBV. Les cellules épithéliales de l'estomac peuvent être infectées à partir de cellules B porteuses de l'EBV réactivées. Pendant l'infection latente, l'EBV utilise des mécanismes cellulaires pour 1 : le maintien du génome viral dans les cellules hôtes, 2 : l'hyperméthylation des gènes viraux et de l'hôte, 3 : l'altération de l'expression des miARN et la sécrétion d'exosomes, ce qui entraîne le développement et la progression des CGaEBV. (Abe et al., 2015).

2.2.4.4. Altérations génomiques et expression des gènes dans les cancers gastriques associés à l'EBV

Les progrès récents dans l'étude du génome et l'utilisation des techniques à haut débit pour explorer les altérations génétiques dans le cancer ont pu fournir de nouveaux moyens afin d'étudier de manière exhaustive le CGaEBV aux niveaux moléculaire et génétique. Ces techniques ont permis aux chercheurs d'identifier des anomalies génétiques relativement inconnues et peu fréquentes qui ne peuvent être trouvées à l'aide d'approches conventionnelles.

De nombreuses études ont pu identifier plusieurs altérations génomiques dans les CGaEBV, dont la plus récente et la plus large est l'étude effectuée par le groupe de recherche de TCGA. Cette étude a identifié des mutations récurrentes des gènes *PIK3CA* (80%), *ARID1A* (55%) et *BCOR* (23%), alors que la mutation du gène *TP53* (codant pour p53) fréquemment retrouvé dans les CG est extrêmement rare dans les CGaEBV. Une autre caractéristique importante des CGaEBV est la surexpression du ligand (PD-L) 1 et 2 (*programmed death-ligand*) (*The Cancer Genome Atlas Research Network.*, 2014).

- ***PIK3CA*** : ce gène code pour la protéine (p110 α) qui est une sous unité de l'enzyme PI3K impliqué dans la voie PI3K / Akt, les mutations dans ce gène sont fréquentes dans les cancers de divers organes, comme le côlon, le sein, l'endomètre et l'ovaire, elle sont principalement au niveau de l'exon 9 (E542K et E545K) et à l'exon 20 (H1047R) (Samuels et Velculescu., 2004; Samuels et Waldman., 2010).

- Des études suggèrent que la mutation du *PIK3CA* précède l'infection par l'EBV, ce qui augmente les fonctions de ce gène muté dans l'activation de la voie PI3K / Akt. En effet, la protéine virale LMP-2A est connue pour réguler positivement les voies PI3K / Akt (Bultema et al., 2008), et la méthylation de l'ADN induite par l'EBV de PTEN et d'INPP4B (inhibiteurs de la voie PI3K / Akt) pourrait contribuer à ce processus (Hino et al., 2009; Yuen et al., 2014). La découverte des mutations dans le gène *PIK3CA* a une grande importance dans le domaine de la thérapeutique car l'inhibition de la voie PI3K / Akt peut augmenter l'efficacité thérapeutique des cancers associés à l'EBV. Par exemple, l'inhibiteur de PI3K Ly294002 a montré qu'il augmente l'effet du 5-fluorouracile (traitement pour le cancer) dans une lignée cellulaire de CGaEBV. À l'heure actuelle, les inhibiteurs doubles de PI3K et sa cible en aval de la rapamycine ont été utilisés dans des essais cliniques et peuvent être inclus dans les schémas de traitement pour les cancers associés à l'EBV (Chen et al., 2012(a)).

- ***ARID1A*** : ce gène code pour une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine SWI / SNF et est actuellement considéré comme un gène suppression de tumeur

en régulant la structure de la chromatine et l'expression des gènes (Wilson et Roberts., 2011). *ARID1A* est fréquemment muté dans le CG avec instabilité des micro-satellitaire ainsi que dans les CGaEBV. Les études d'immunohistochimies indiquent que l'absence de l'expression d'*ARID1A* dans le CGaEBV est indépendante du degré de la profondeur de l'invasion tumoral, ce qui indique que la perte d'*ARID1A* est un événement précoce dans la carcinogenèse des CGaEBV (Abe et al., 2012). De plus, il a été démontré que les mutations dans *ARID1A* sont présentes dans la muqueuse gastrique chroniquement enflammée et infectée par *H. pylori* (Shimizu et al., 2014). Ces observations confirment que la mutation de ce gène précède l'infection par l'EBV. Ces mutations conduisant à l'altération au niveau de la structure chromatinienne qui pourraient faciliter l'entrée virale dans le noyau et la manipulation des mécanismes de méthylation (Day et al., 2007; Abe., 2015).

- ***BCOR*** : ce gène code pour un corépresseur de transcription de *BCL-6*, il est fréquemment muté dans les leucémies aigüe myéloïdes ; récemment démontré, *BCL6* réprime *GLI1* et *GLI2*, les effecteurs de la voie *SHH* qui intervient dans le contrôle de la division cellulaire, la mutation de *BCOR* est induit des perturbations de la division cellulaire et la prolifération anarchiques des cellules (Tiberi et al. 2014).

- **Amplification de *PD-L1* et *PD-L2*** : *PD-1*(*programmed cell death protein 1*) est une protéine de la famille des immunoglobulines, présente à la surface des lymphocytes T, des lymphocytes B et des macrophages qui joue un rôle de régulation négative de la réponse immunitaire. Les ligands de *PD-1*, *PD-L1* et *PD-L2* exprimés par les cellules tumorales, exercent un effet inhibiteur sur les lymphocytes T pour échapper à l'immun surveillance (Pedoeem et al., 2014).

Étant donné que les CGaEBV présentent une infiltration lymphocytaire nettement dense dans les amas de cellules tumorales et le stroma tumoral (Song et al., 2010), l'échappement de l'action des lymphocytes est essentielle pour la progression de la tumeur, ceci explique l'amplification des gènes *PD-L1* et *PD-L2* et la surexpression de leurs produits observés dans les CGaEBV (Derks et al., 2016; Dong et al., 2016). La découverte de l'amplification des gènes *PD-L1* et *PD-L2* à une grande importance dans le domaine de la thérapeutique, les stratégies actuelles consistent à inactiver la voie de signalisation *PD1/PD-L1* à l'aide d'anticorps monoclonaux, qui ciblent soit *PD-1* soit *PD-L1*. Des études ont montré l'intérêt et l'activité aussi bien d'anticorps anti-*PD-1* (Topalian et al. 2012) que d'anticorps anti-*PD-L1* (Herbst et al. ,2014 ; Powles et al., 2014). Cette stratégie a également été appliquée sur les CGaEBV et elle a donné des résultats très intéressants (Dai et al., 2016).

CHAPITRE 3

MATERIELS ET METHODES

Ce travail comporte trois principaux volets:

- L'étude de l'infection par l'EBV dans le CG et son implication dans le processus tumoral. Nous avons ici effectué la détection de l'expression des EBERs dans les tissus cancéreux gastriques et dans des lésions précancéreuses. Cette étude a permis de déterminer la fréquence des CGaEBV et les caractéristiques cliniques et pathologiques des malades EBV-positifs.

- L'étude de l'infection latente par l'EBV dans le CG. Nous avons ici effectué la détection de l'expression de LMP-1 dans les tissus gastriques tumoraux, puis la détection simultanée de l'expression des EBERs et de LMP-1.

- La recherche de marqueurs spécifiques pour le diagnostic du CGaEBV. Nous avons ici étudié l'expression de la protéine LMP-1 dans le sérum sanguin de patients algériens atteints de CG.

À la fin de ce travail, nous discuterons l'ensemble des résultats de notre étude, de leurs significations et de leurs perspectives avec une synthèse rapprochée de la littérature.

3.1. Détection du virus d'Epstein-Barr dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses

L'hybridation in situ (ISH) est la technique de référence pour détecter l'expression d'EBER-1 et EBER-2, afin de déterminer la présence d'une infection par l'EBV. Cette technique s'effectue sur un tissu fixé au formol et enrobé en paraffine.

Dans notre travail, nous avons utilisé deux dérivées de l'ISH, la FISH et la CISH, afin de détecter l'expression des EBERs sur des coupes de tissus gastriques fixés au formol et enrobés dans la paraffine. Nous avons en premier lieu utilisé une approche par FISH, puis nous avons appliqué la CISH afin de tester son efficacité dans la détection des EBERs, puisqu'il s'agit d'une technique très récente et spécifique mais également pour confirmer la sensibilité et la spécificité de la FISH.

D'une façon générale, l'ISH correspond à la détection microscopique d'un signal d'hybridation entre une sonde marquée et un acide nucléique ADN ou ARN. Cette technique repose sur les propriétés physico-chimiques des acides nucléiques comme la complémentarité des bases constitutives de l'ADN et l'ARN d'une part, et la réversibilité du processus de dénaturation et renaturation d'autre part. Les sondes utilisées peuvent être marquées par un isotope radioactif révélé par autoradiographie, ou par une molécule non-radioactive (fluorochrome, biotine, digoxigénine) visualisée soit au microscope à fluorescence, soit par une réaction colorée visible au microscope optique standard.

L'ISH est la technique optimale pour localiser les acides nucléiques dans les différents territoires d'un tissu ou d'une cellule, et permet de préciser le type de cellule contenant le signal.

3.1.1. Matériels

- **Population d'étude**

Nous avons obtenu l'autorisation de mener l'investigation sur des échantillons humains selon les principes d'éthique mentionnés dans la déclaration d'Helsinki (53^{ème} Assemblée générale de l'AMM, Washington DC, États Unis, Octobre 2002) par le comité d'éthique du Centre Hospitalo-Universitaire (CHU) Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou (Réf : CSF/SNV/1-2013). Notre étude a été menée sur 113 échantillons correspondant à 97 cas de tissus cancéreux gastriques, 6 cas de tissus précancéreux correspondant à des dysplasies gastriques et 10 cas de biopsies non néoplasiques présentant une simple gastrite.

Pour cette étude nous avons utilisé un témoin positif afin de contrôler le bon déroulement et la réussite de la technique, ce témoin positif est un échantillon provenant d'un cas de lymphome de Hodgkin testé auparavant positif pour l'EBV dans le même laboratoire d'anatomo-pathologie. Tous les cas sélectionnés proviennent de patients algériens consultés entre 2010 et 2013, ayant subi soit une gastrectomie totale ou partielle, soit une résection biopsique par endoscopie dans le but d'obtenir un diagnostic. Les échantillons provenant de patients ayant subi un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie ont été exclus de la sélection.

Les tissus étudiés ont été fixés au formol, enrobés en paraffine et conservés dans des blocs dans le laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU Nedir Mohammed de Tizi-Ouzou, Algérie. Les données cliniques et pathologiques concernant l'âge, le sexe, la localisation de la tumeur, le degré de l'extension tumorale, le type histologique et le degré de la différenciation tumorale ont été recueillies par consultation des dossiers médicaux et du rapport des examens anatomopathologiques.

Afin de confirmer le diagnostic de chaque échantillon, des coupes histologiques colorées à l'hématoxyline-éosine ont été examinées par un médecin anatomopathologiste. Cette étape a également permis le choix d'un bloc de paraffine représentatif de la lésion tumorale pour chaque cas, ainsi que la localisation des endroits sur les coupes pour l'exploitation moléculaire.

• Sondes et anticorps

Les sondes utilisées dans cette étude sont achetées de Dako Cytomation (Y5200), c'est un mélange de 4 sondes différentes formées d'acide nucléique peptidique (PNA) marquées à la fluorescéine complémentaire à des parties des deux ARN EBER-1 et EBER-2. Ces sondes permettent la détection des EBERs par hybridation in situ en un seul jour sur des coupes tissulaires fixées au formole et enrobés en paraffine.

Les PNA reproduisent la configuration de l'ADN (Figure 3.21), elles sont synthétisées pour contenir un squelette polyamide de N-(2-aminoéthyl) glycine ou les bases azotées sont attachées d'une façon covalente, elles se notent donc comme des peptides, avec deux extrémités N-terminale et C-terminale. La nature non chargée des sondes PNA leurs fournit une stabilité thermique, une forte pénétration dans le tissu, et une résistance à la destruction enzymatique par des nucléases et des protéases qui leurs permet une plus longue durée de vie. La courte longueur de la sonde offre une plus grande spécificité (Just et al., 1998 ; Ray et Nordén., 2000)

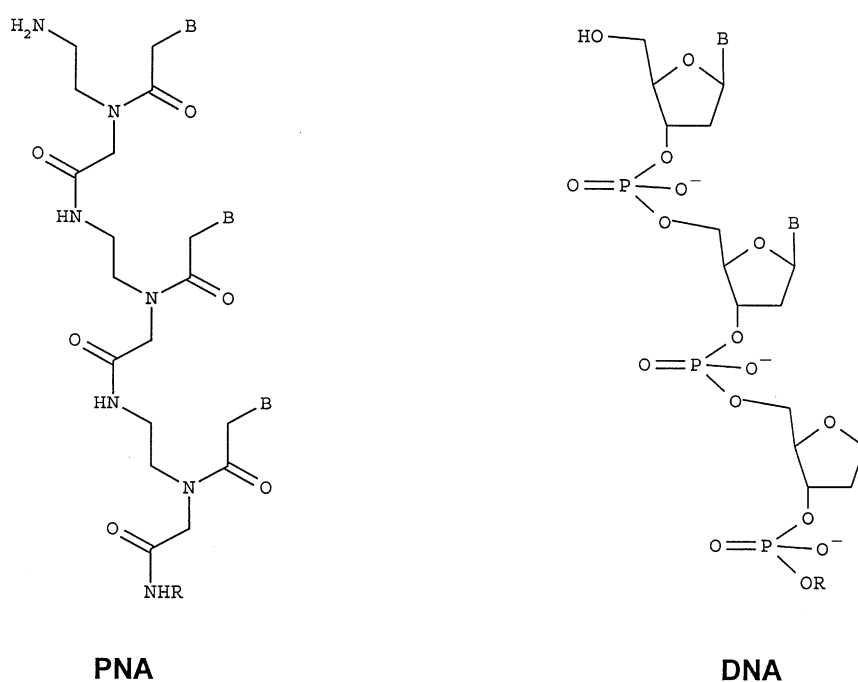


Figure 3. 21: Structure chimique de l'ADN et de PNA. Les PNA sont formées d'un squelette polyamide de N-(2-aminoéthyl) glycine (B) indique les bases azotées (adénine, guanine, cytosine ou thymine) ; d'après (Just et al., 1998).

Nous avons utilisé aussi des sondes composées d'oligo (d)T pour contrôler la préservation de l'ARN dans les coupes histologiques. Pour la détection des hybrides après

hybridation in situ en fluorescence, nous avons utilisé le kit Alexa Fluor 488 (Invitrogen USA A10235), ce kit contient un premier anticorps lapin anti-FITC qui se lie sur la sonde marquée à la fluorescéine, et un second anticorps chèvre anti IgG de lapin qui se fixe sur le premier anticorps afin d'améliorer encore le signal.

Pour la détection du signal après l'hybridation in situ chromogénique, nous avons utilisé l'anticorps lapin anti-FITC couplé à la phosphatase alcaline (Dako 5201) et le substrat enzymatique (BCIP/NBT) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl/4-nitroblue tetrazolium chloride phosphate (Invitrogen 34042).

3.1.2. Méthodes

3.1.2.1. Hybridation in situ en fluorescence (FISH) :

Cette technique de diagnostic morphologique comprend cinq étapes qui sont les suivantes:

- **Préparation des coupes histologiques**

Des coupes de 3 à 4µm sont réalisées à l'aide d'un microtome à partir de blocs de tissus fixés au formol et enrobés en paraffine. Le microtome est muni d'une lame échangeable permettant la réalisation des coupes dépourvues de stries et de plis. Les coupes ont été rapidement recueillies sur un bain d'eau distillée puis étalées sur des lames silanisées qui garantissent l'adhésion du tissu sur la lame pendant les étapes de la technique. Les lames sont par la suite séchées dans un incubateur à 60° pendant 1 heure puis conservées à 37° jusqu'à la prochaine étape.

Il faut bien mentionner que tout au long des étapes de cette technique, la contamination avec l'ARNase a été strictement évitée. La verrerie utilisée (lames et lamelles) a été incubée pendant toute une nuit à 200°C afin d'éliminer toute trace d'ARNase.

- **Prétraitement des coupes et perméabilisation**

Avant de procéder au protocole de coloration, les lames doivent subir deux étapes successives sont le déparaffinage et la digestion protéolytique.

Le déparaffinage est effectué dans deux bains de xylène pendant 5 min chacun, il est à noter que l'élimination incomplète de la paraffine peut provoquer une mauvaise coloration de la section. Par la suite et pour éliminer le xylène résiduel et réhydrater les coupes, les lames sont passées dans deux bains d'éthanol absolu suivi de deux bains d'éthanol à 95% pendant 3 minutes puis un lavage dans DEPC-H₂O (diethyl pycarbonate H₂O, spéciale pour

l'hybridation in situ qui inactive les ARNase, elle est utilisée pour toute les dilution et lavage au lieu de l'eau distillée).

Les préparations histologiques sont soumises à une digestion protéolytique pour favoriser l'accessibilité de la sonde à sa cible et diminuer le bruit de fond par une meilleure perméabilité du stroma. La digestion se fait dans une solution de protéinase K (500µl dilué dans 4.5ml d'un tampon Tris salin TBS (Tris buffered saline) appliquée pendant 3 minutes à 37°C; afin d'inactiver la digestion, les lames sont incubées dans 0.1 mg glycine dans TBS pendant 30 s pour inactiver la protéinase K suivie d'un lavage dans la TBS puis deux bains DEPC-H₂O.

Enfin, les lames sont passées successivement dans des bains d'éthanol à (70°, 90° et 100°, DEPC-H₂O) puis séchées à température ambiante pendant 2 heures dans l'enceint humide.

• Hybridation

Une quantité aliquote de 10 µl de la solution d'hybridation contenant la sonde PNA EBERs a été appliquée sur chacune des préparations et recouverte d'une lamelle de verre sertie à l'aide d'une colle (rubber cement ; Fixogum Marabou, Tamm. Germany). Les lames sont placées dans une enceint humide et incubées dans un incubateur à 55° pendant une heure.

• Lavage de stringence

Les étapes de lavage après hybridation permettent d'éliminer les sondes non hybridées et d'assurer la stabilisation préférentielle des hybrides appariés. Ce lavage de stringence consiste à faire passer les lames dans des solutions salines faiblement concentrés, avant ces étapes les lamelles sont enlevées. Le premier lavage se fait dans une solution composée de 40% formamide et 5xSSC (Standard Saline Citrate) composé de (0.15M NaCl, 0.15 M sodium citrate, pH 7,) à 55°C pendant 15 minutes. Le deuxième lavage s'effectue dans une solution de 5xSSC à 55°C pendant 15 minutes et le dernier lavage se fait dans une solution se 2xSSC pendant 15 minutes également à température ambiante. Pendant les étapes de lavage les lames restent toujours dans l'enceinte humide pour que les coupes ne dessèchent pas.

• Révélation

Afin de renforcer la fluorescence et la photostabilité des sondes PNA, nous avons utilisé le kit Alexa fluor 488 qui assure l'amplification du signal. Le kit contient l'anticorps primaire Alexa fluor 488 lapins anti-FITC qui se fixent sur la molécule FITC de la sonde

PNA, et un anticorps secondaire Alexa fluor 488 chèvre anti lapin qui se fixe sur l'anticorps primaire.

La révélation du marquage s'effectue à l'aide du microscope LMS Ziess qui peut détecter le signal fluorescent et peut faire également une combinaison entre le signal fluorescent et la technique en contraste de phase qui n'est pas destructive pour la fluorescence. L'idée est de localiser une zone d'intérêt spécifique dans un spécimen à l'aide de la technique en contraste de phase puis, sans relocaliser l'échantillon, passer le microscope au mode fluorescence, et faire une combinaison entre les deux images celle-ci peut donner plus de détail sur la structure du tissu et la localisation spécifique du signal fluorescent.

3.1.2.2. Hybridation in situ chromogénique (CISH)

La CISH est un outil de diagnostic qui utilise des sondes d'acides nucléiques pour reconnaître des séquences spécifiques d'ADN ou ARN. Cette technique représente une combinaison entre la technologie FISH et la détection chromogène spécifique de la technique d'immunohistochimie. Nous avons ici utilisé la CISH sur 9 cas de CG et un cas de tissu non tumoral. Le but de cette étude était de confirmer les résultats de la FISH et de comparer entre les résultats des deux techniques.

Les étapes initiales de préparation des sections histologiques, d'hybridation et de lavage pour la CISH sont identiques à celles de la FISH. La différence entre les deux techniques réside dans le mode de détection des hybrides formés.

En effet, après hybridation, les coupes sont incubées avec un anticorps anti-FITC produit chez le lapin et couplé à la phosphatase alcaline (Dako code 5201) à température ambiante pendant 30 minutes, incubation suivie des étapes de lavages. Les coupes sont par la suite incubées avec le substrat enzymatique BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)/(nitroblue tetrazolium) pendant 30 minutes. Ce substrat est utilisé pour la détection de l'anticorps, les lames sont par la suite lavées afin d'arrêter la réaction. L'observation des coupes se fait à l'aide d'un microscope photonique, les cellules présentant une coloration nucléaire ont été considérées comme positives.

3.1.2.3. Analyse statistique

Les tests Chi-carré (X^2) a été utilisés pour la recherche d'une éventuelle association entre la présence des EBERs et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients. Pour tous les tests statistiques utilisés dans ce travail, une valeur bilatérale de $p \leq 0,05$ a été considérée

comme significative. Donc, si la valeur de p est inférieure ou égale à la valeur de 0,05 choisie, cela signifie qu'il existe une corrélation statistiquement significative entre les deux variables.

3.2. Étude de l'infection latente par le virus d'Epstein-Barr dans le cancer gastrique.

Détection de l'expression de LMP-1

L'étude de l'expression d'une ou plusieurs protéines de latence de l'EBV dans le CG permet de déterminer le type de latence adopté par ce virus, et de comprendre son rôle exact dans la carcinogénèse gastrique. Dans cette partie, nous avons ciblé la détection de l'expression de LMP-1, car d'une part elle est considérée comme l'oncogène majeur de l'EBV, et d'autre part sa présence dans le CG a souvent été controversée dans la littérature. Cette partie comprend trois volets :

- Nous avons utilisé deux techniques d'immuno-marquages, l'immunofluorescence (IF) indirecte et l'immunohistochimie (IHC), en utilisant deux anticorps anti LMP-1 différents. L'intérêt d'utiliser ces deux techniques réside en la possibilité de comparer les résultats et d'étudier leurs spécificités et sensibilités dans la détection de LMP-1. En outre, la technique d'IHC donne plus de détails morphologiques que l'IF.

- Nous avons aussi pour but de déterminer la nature des cellules exprimant LMP-1. Nous avons recouru à une approche à double marquage par IF pour détecter simultanément LMP-1 et la cytokératine. La cytokératine est caractéristique des cellules épithéliales ; sa co-localisation avec la protéine LMP-1 indique que cette dernière est exprimée dans les cellules épithéliales, et non pas dans les cellules du stroma tumoral ou les lymphocytes circulants.

- Enfin, nous avons cherché à effectuer une détection simultanée de l'expression du produit d'un gène de latence, ici LMP-1, et des transcrits viraux, ici les EBERs, sur des coupes tissulaires de CG. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique de double marquage à IF et FISH. Cette approche a permis de tester la présence des EBERs et de LMP-1 dans les tissus tumoraux gastriques, et d'identifier les cellules infectées par l'EBV exprimant LMP-1.

3.2.1. Matériels

- **Population d'étude**

Les deux techniques d'IF et IHC ont été appliquées sur tous les échantillons de tissus cancéreux gastriques EBV positifs par FISH. La technique de double marquage à IF réalisée pour la détection simultanée de la LMP-1 et la cytokératine a été appliquée sur 5 échantillons de cas de CG EBV positive par FISH. Pour les deux techniques IF et IHC un témoin positif a

été utilisé correspondant à un cas de lymphome de Hodgkin déjà testé positive pour LMP-1 dans notre laboratoire.

- **Réactifs**

Les anticorps utilisés pour la détection de la protéine LMP-1 sont :

Deux anticorps primaires monoclonaux anti LMP-1: l'anticorps souris anti LMP-1 S12 reconnaît la portion C-terminal de la protéine LMP-1, il a été cordialement offert par le professeur Ooka Tadamasa (Laboratoire de virologie moléculaire CNRS, Lyon, France). L'anticorps souris anti LMP-1 CS1-4 est un mélange de quatre anticorps monoclonaux CS1, CS2, CS3 et CS4 qui reconnaissent ensemble les trois épitopes de la molécule, acheté de (Dako, Cytomation, IR753).

Pour la technique de double marquage à immunofluorescence, nous avons utilisé également l'anticorps monoclonal anti-cytokeratine (CK 7 ab90083, abcam).

Les anticorps secondaires utilisés pour l'immunofluorescence sont : Alexa Fluor 488 conjugué à la fluorescéine isothiocyanate FITC (vert) et Alexa Fluor 568 conjugué à la tétraméthylrhodamine isothiocyanate TRITC (rouge) (Invitrogen, USA).

L'anticorps secondaire utilisé pour l'immunohistochimie est le kit EnVision (DakoCytomation, K4061) ayant une sensibilité très élevée et générant peu de bruit de fond car il est formé d'un polymère de dextran qui porte sur un côté l'anticorps secondaire spécifique à l'anticorps primaire et de l'autre côté plusieurs molécules d'enzyme de révélation la peroxydase de Raifort (HRP).

3.2.2. Méthodes

Les techniques d'immunomarquages sont des techniques de détection morphologique des molécules de nature protéique ou glycoprotéique ayant valeurs de motifs antigéniques dans les structures tissulaires ou cellulaires. Ces techniques utilisent des anticorps spécifiques souvent de lapin ou de souris dirigées contre les antigènes recherchés, ces anticorps peuvent être conjugués à un traceur soit fluorescent ou enzymatique fixé directement ou indirectement sur l'anticorps permettent de détecter la liaison entre l'anticorps et sa cible.

3.2.2.1. Immunofluorescence

La technique d'immunofluorescence passe par plusieurs étapes, brièvement, des coupes histologiques de 3 µm d'épaisseur sont réalisées grâce à l'utilisation d'un microtome, les coupes étalées sur des lames silanisées sont déparaffinées et réhydratées suivant les mêmes

étapes de préparation et confection de coupes déjà décrites pour la technique d'hybridation in situ en fluorescence.

Par la suite, un démasquage antigénique est nécessaire afin d'augmenter l'immuno-activité des antigènes parfois perdu pendant les étapes de fixation au formol et les étapes de confection des coupes. Le démasquage est réalisé par la chaleur en immergeant les préparations dans un tampon citrate (acide citrique monohydraté) à pH:6.0 chauffé à 98° dans un bain-marie pendant 10 minutes.

Après refroidissement à température ambiante, les lames sont lavées dans un tampon TBS trois fois à pH: 7.0 puis dans l'eau distillée. Par la suite, l'anticorps primaire S12 anti LMP-1 est appliqué à une dilution 1 :500 dans le PBS (Phosphate Buffred Saline) pendant une heure.

Les préparations sont par la suite lavées trois fois dans un tampon TBS puis dans de l'eau distillée. Elles sont ensuite incubées avec l'anticorps secondaire chèvre anti souris Alexa Fluor 488 conjugué à la FITC dilué à 1 :1000 pendant une heure et dans une chambre noire. Après le lavage dans 3 bains de TBS et d'eau distillée, les lames sont prêtes à être observées sous un microscope à fluorescence. La positivité consiste à une coloration fluorescente en vert brillant.

3.2.2.2. Double marquage à immunofluorescence

Afin de déterminer le phénotype des cellules exprimant la protéine LMP-1, nous avons appliqué une double coloration à IF pour détecter simultanément LMP-1 et la cytokératine 7.

Il existe 20 types de cytokératine, classées de 1 à 20. Les cytokératines font partie de la composition des filaments intermédiaires du cytosquelette des cellules épithéliales. Les épithéliums se distinguent donc des autres tissus histologiques par la présence des molécules de cytokératine.

Dans notre étude, nous avons utilisé l'anticorps anti LMP-1 (S12) produit chez la souris, et l'anticorps polyclonal anti-cytokératine (CK7) produit chez le lapin. Cet anticorps permet la détection spécifique des cellules épithéliales gastriques.

La technique de double coloration à IF a été utilisée sur 10 cas de CG préalablement testés par FISH, et EBERs-positifs avérés. Les étapes initiales de préparation des sections histologiques et de démasquage antigénique sont identiques à celles de l'IF. Ces étapes sont suivies d'une incubation des préparations histologiques avec les anticorps primaires S12 et CK7 simultanément, et ce pendant une heure, à température ambiante.

La révélation des complexes antigènes-anticorps est réalisée après incubation avec deux anticorps secondaires différents, chèvre anti souris Alexa fluor 488 conjugué à FITC pour

détecter l'anticorps anti LMP-1, et chèvre anti lapin Alexa fluor 568 conjugué à TRITC pour détecter la cytokératine. Les coupes sont contre coloré par le DAPI qui colore les noyaux.

Après les étapes de lavage avec le tampon PBS et l'eau distillée, les lames sont observées sous un microscope à fluorescence muni de filtres rouge et vert. Un signal fluorescent vert indique la présence de LMP-1 et un signal fluorescent rouge indique la présence de la cytokératine. La superposition des images obtenues permet de déterminer une éventuelle co-localisation de LMP-1 et de la cytokératine. Un évènement de co-localisation apparaît alors en jaune. Il est important de préciser que toutes les étapes suivant l'application des anticorps secondaires se font en chambre noire.

3.2.2.3. Immunohistochimie

Pour cette technique, les étapes de préparation des sections histologiques et de démasquage antigénique ont été réalisées de la même manière que pour l'IF. Suivant le démasquage, l'activité des peroxydases endogènes est bloquée en utilisant le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 à 3% pendant 5 minutes. Les lames sont lavées à l'eau distillée puis dans le TBS 0,05 M pH 7,4.

Par la suite, l'anticorps anti LMP-1 (CS1-4) dilué à 1:200 est appliqué pendant une heure. La révélation des complexes anticorps-antigènes est réalisée par incubation avec le polymère de dextran conjugué à des anticorps secondaires marqués à l'enzyme HRP (peroxydase de raifort) pendant 30 minutes, suivie d'un lavage à l'eau distillée.

La révélation de l'activité peroxydase est réalisée par incubation dans un substrat chromogène (3,3'-diaminobenzidine, DAB) pendant 5 minutes. Les coupes sont ensuite contre-colorées à l'hématoxyline, puis montées.

L'observation des préparations histologiques est effectuée à l'aide d'un microscope optique et un signal positif consiste en une coloration brunâtre et granulaire.

3.2.2.4. Double marquage à immunofluorescence et hybridation in situ en fluorescence

Nous avons cherché ici à détecter simultanément les EBERS et LMP-1 sur une même coupe tissulaire de CG, ceci par double marquage à IF et FISH, l'objectif de cette étude étant d'une part de confirmer la sensibilité des deux techniques appliquées séparément, et d'autre part de confirmer la présence de LMP-1 dans le CGaEBV.

Nous avons appliqué cette technique sur 15 échantillons de CG fixés au formol et enrobés dans la paraffine. Cette technique, très délicate et minutieuse, commence par le marquage IF, suivi par la FISH, dont les étapes sont brièvement décrites ici.

Les coupes de paraffine sont tout d'abord déparaffinées dans deux bains de xylène pendant 5 minutes, et hydratées dans des bains d'éthanol croissants.

Les coupes sont par la suite incubées dans une solution de protéinase K pendant 3 minutes à 37°C pour assurer la digestion protéolytique, puis incubées dans 0.1 mg glycine/TBS pendant 30 secondes pour inactiver la protéinase K. Après un lavage dans le TBS, puis dans DEPC- H₂O, les lames sont hydratées dans des bains d'éthanol croissants puis séchées à température ambiante pendant 2 heures dans une enceinte humide.

Un démasquage antigénique est par la suite réalisé. Les lames sont incubées dans un tampon citrate à pH 6.0 chauffé à 98°C pendant 10 minutes, puis lavées dans le TBS, puis dans DEPC-H₂O. L'anticorps anti-LMP-1 S12 (1:500) est appliqué pendant une heure. Les coupes sont lavées 3 fois dans le TBS, puis dans DEPC-H₂O. L'anticorps secondaire Alexa Fluor 568 conjugué au TRITC (rouge) est alors appliqué pendant une heure. À partir de cette étape, le travail est réalisé dans une chambre noire.

Par la suite, les coupes sont hybridées avec les sondes PNAs. L'étape d'hybridation, le lavage de stringence, ainsi que la révélation sont effectués de la même manière que dans la technique FISH déjà décrite.

3.3. Détection de la protéine LMP-1 dans le sang des patients atteints de cancer gastrique par le test ELISA

3.3.1. Matériels

- **Population d'étude**

Nous avons collecté 20 échantillons de sérums de patients atteints de CG admis au service de chirurgie générale du CHU Nedir Mohammed de Tizi-ouzou, les patients n'ont pas subis aucun type de traitement chimique ou radiologique. Nous avons également récolté 21 échantillons de sérums de sujets sains auprès du laboratoire de biochimie du même centre.

Pour le témoin négatif nous avons utilisé le sérum d'un cordon ombilical qui doit être non contaminé par l'EBV. Le témoin positif a été un extrait protéique de la lignée cellulaire P3HR1 exprimant la LMP-1.

- **Anticorps**

Nous avons utilisé l'anticorps anti LMP-1 S12 et un anticorps secondaire anti souris couplé à la peroxydase. D'autres produits ont été utilisés : la BSA (Bovine Serum Albumin), PBS et la tetra-méthylbenzidine (TMB). Pour ce test nous avons utilisé une plaque ELISA et un lecteur ELISA (bioTek).

3.3.2 Méthode

Pour la recherche de LMP-1 et la détection de sa concentration dans les sérums des patients nous avons appliqué la technique ELISA indirecte, ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) est une technique très commune et robuste pour détecter diverses substances. La technique ELISA entraîne la formation de complexes immuns spécifiques qui peuvent être mesurés, l'application de cette technique se fait en quatre étapes :

- "Coating" de l'antigène : c'est d'incuber dans des puits, la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché. 3 µl de sérum complétés à 50 µl du PBS sont incubés toute la nuit à +4°C. La plaque ELISA est ensuite lavée trois fois avec du PBS additionnée de tween à 1% puis trois fois avec du PBS. On procède à la saturation de la plaque avec la BSA à 2% (dans du PBS).

La plaque est incubée pendant une heure à 37°C suivie d'un lavage trois fois avec du PBS-tween 1% puis trois fois avec PBS 1% pour éliminer les antigènes en excès.

- Fixation de l'anticorps LMP-1 : 100 µl d'anticorps anti LMP-1 sont rajoutés dans chaque puits et incubés à 37°C pendant 2 heures. La plaque est lavée trois fois avec du PBS-tween 1% puis trois fois avec PBS 1% pour éliminer les anticorps à doser en excès.

- Fixation de l'anticorps de détection : l'anticorps secondaire anti souris couplé à la peroxydase et incubé pendant 30 mn à 37°C. La plaque est lavée 6 fois avec du PBS-tween 1% puis 6 fois avec PBS 1% afin d'éliminer l'excès d'anticorps.

- Révélation d'anticorps fixés : on rajoute 50 µl/ml de tetraméthylbenzidine (TMB) comme substance révélatrice et on incube à l'obscurité pendant 10 mn à température ambiante. Par la suite on arrête la réaction par l'ajout de 50 µl/ml d'acide phosphorique 0.1 M. la lecture se fait à 450 nm par un lecteur ELISA à absorbance.

3.3.3. Analyse statistique

Afin de comparer la positivité de chaque échantillon par rapport au témoin négatif, le test de conformité d'une moyenne a été utilisé. Ce test est relatif à l'hypothèse nulle : $H_0 : m = m_0$, qui est basé également sur les distributions de STUDENT.

Pour les patients positifs pour l'expression de LMP-1 l'hypothèse nulle H_0 est rejetée exprimant ainsi la non-conformité de ces échantillons au témoin négatif. Cependant lorsque l'hypothèse nulle H_0 est accepté ceci montre bien que ces échantillons sont négatifs à l'expression de LMP-1 puisque ils sont conformes au témoin négatif

CHAPITRE 4

RESULTATS ET DISCUSSION

4.1. Résultats et discussion de l'étude : Détection du virus d'Epstein-Barr virus dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses

4.1.1. Résultats

4.1.1.1. Description de la population étudiée, caractéristiques cliniques et pathologiques

De Janvier 2010 à Juin 2013, nous avons récolté 113 spécimens de tissus gastriques correspondant à 97 cas de CG, 6 cas de tissus précancéreux correspondant à des dysplasies, et 10 cas de tissus non néoplasiques correspondant à des gastrites. Sur les 97 cas de CG, on dénombre 67 (69 %) patients males et 30 (31 %) patients femelles (sex-ratio M/F de 2.22). L'âge moyen des patients est de 56 ans, avec les valeurs extrêmes de 25 ans et 84 ans.

Nous avons réparti les cas sélectionnés selon 3 tranches d'âge (> 45 ans, entre 45 et 60 ans et < 60 ans). La fréquence la plus élevée de CG a été observée chez les patients d'âge supérieur à 60 ans. La distribution en fonction du sexe et des tranches d'âge fait apparaître une prédominance masculine dans toutes les tranches d'âge, excepté dans la tranche inférieure à 45 ans, où on a noté une prédominance féminine (Figure 4.22).

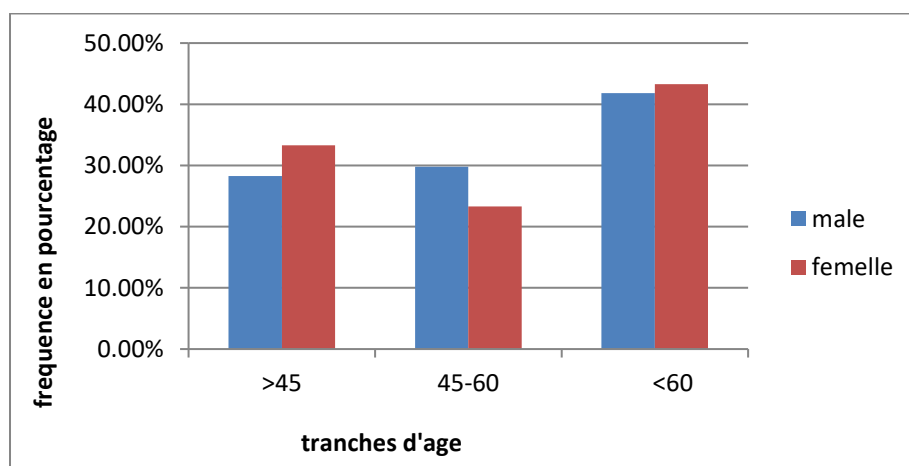


Figure 4.22: Répartition selon le sexe et les tranches d'âge des patients sélectionnés atteints de cancer gastrique.

L'analyse des comptes rendus de l'étude anatomopathologique nous a permis de faire une répartition des cas de tumeur sélectionnés selon plusieurs critères : le site anatomique de la tumeur, le type histologique défini selon la classification et sous-classification de Lauren (1965), et enfin, le grade tumoral, basé sur le degré de la différenciations cellulaire du tissu étudié. Le Tableau 4.6 rassemble les caractéristiques clinico-pathologiques des cas sélectionnés.

Nous avons observé une prédominance de tumeurs localisées au niveau antral, représentant près de 53.6 % des tumeurs sélectionnées. Les tumeurs localisées au niveau fundique ont une proportion égale à 26.8 % et celles au niveau du corps de l'estomac représentent 19.5 %. Concernant le type histologique, la classification de Lauren définit deux types, intestinal et diffus. Dans notre cohorte, le type intestinal représente 41.2 % et le type diffus 58.7 %. Une prédominance du type diffus par rapport au type intestinal a été observée chez les malades de sexe féminin.

L'observation du grade tumoral de nos échantillons indique la présence dans notre population d'étude des trois degrés de différenciation cellulaire : bien, moyennement et peu différencié. Près de 58.7 % des cas sont d'un grade avancé de développement tumoral, ce qui correspond au grade peu différencié.

Tableau 4.6: Caractéristiques cliniques et pathologiques de tous les malades sélectionnés.

Caractéristiques Cliniques et pathologiques	Totale		Male		Femelle	
	N(97)	%(100)	N (67)	%(100)	N (30)	%(100)
Age						
>45	29	(29.8)	19	(28.3)	10	(33.3)
45-60	27	(27.8)	20	(29.8)	7	(23.3)
<60	41	(42.2)	28	(41.8)	13	(43.3)
Site Anatomique						
Fundus	26	(26.8)	17	(25)	9	(30)
Corps	19	(19.5)	16	(23.8)	3	(10)
Antre	52	(53.6)	34	(50)	18	(60)
Type Lauren						
Intestinal	40	(41.2)	30	(44.8)	10	(33.3)
Diffus	57	(58.7)	37	(55.2)	20	(66.6)
Degré de différenciation						
Bien	21	(21.6)	17	(25.3)	4	(13.3)
Moyennement	19	(19.6)	15	(22.3)	4	(13.3)
Peu	57	(58.7)	35	(52.3)	22	(73.3)

La répartition des cas de cancers gastriques selon la sous-classification histologique de Lauren est représentée dans le tableau 4.7. Le type histologique intestinal regroupe les sous-types suivants : adénocarcinome papillaire (pap), adénocarcinome tubulaire bien différencié (tub1), adénocarcinome tubulaire moyennement différencié (tub2).

Le type histologique diffus contient les sous-types suivants : adénocarcinome peu différenciés de type solide (por1), ou de type non-solide (por2), adénocarcinome à cellules indépendantes dite cellules en bague à chaton (signet ring cells) (sig) et carcinomes à stroma lymphoïde (Lymphoepithelium like carcinoma) (LELC).

Parmi les 97 cas de CG sélectionnés, les adénocarcinomes ordinaires représentent 94 % (91/97) de la population, les 6 autres cas (6.2 %) étant des carcinomes indifférenciés correspondant aux LELC (Watanabe et al., 1976). Ce type a fait l'objet de plusieurs études, démontrant sa forte association avec l'EBV (plus de 80 %), c'est pour cette raison ce type histologique est traité séparément des autres types histologiques..

Tableau 4.7: Distribution des sous type histologique des cas de cancer gastrique sélectionnés selon le sexe.

Type lauren	Totale		Male		Femelle	
	N (97)	%(100)	N(67)	%(100)	N(30)	%(100)
Intestinale	40	(41.2)	30	(75)	10	(25)
pap	3	(7.5)	3	(10)	0	(0)
tub1	17	(42.5)	12	(40)	5	(50)
tub2	20	(50)	15	(50)	5	(50)
Diffus	57	(58.7)	37	(64.2)	20	(35.1)
por1	23	(40)	16	(43.2)	7	(35)
por2	18	(31.5)	13	(35.1)	5	(25)
sig	10	(17.5)	5	(13.5)	5	(25)
LELC	6	(10.5)	3	(8.1)	3	(15)

Pap: adénocarcinome papillaire; tub1: adénocarcinome tubulaire bien différencié; tub2: adénocarcinome tubulaire moyennement à peu différencié; por1: adénocarcinome solide peu différencié; por2: non solide peu différencié; sig: adénocarcinome en bague à chaton; LELC: carcinome de type lymphoépithelial.

4.1.1.2. Détection de l'EBV dans les tissus gastriques. Statut et fréquence des EBERs par Hybridation in situ en fluorescence

Nous avons utilisé la technique d'hybridation in situ pour détecter les EBER-1 et -2 dans les CG. Nous avons comparé deux systèmes de détection des hybrides ; l'un fait appel à la fluorescence (FISH) et l'autre à un système enzymatique (CISH).

Parmi les 97 cas de CG étudiés, 22 cas (22.7 %) se sont révélés positifs pour les EBERs par FISH. Parmi ce nombre, on retrouve des cas de type carcinomes à stroma lymphoïde ou Lymphoepithelioma-Like Carcinoma (LELC), qui sont d'ordinaire fortement associées à l'EBV. Ici, ils représentent 66.6 % (4 cas sur 6). En excluant ce type de cancer, la prévalence des cas d'adénocarcinomes ordinaires associés à l'EBV est égale à 19.78 % (18 des 91 cas d'adénocarcinomes) (Figure: 4.23).

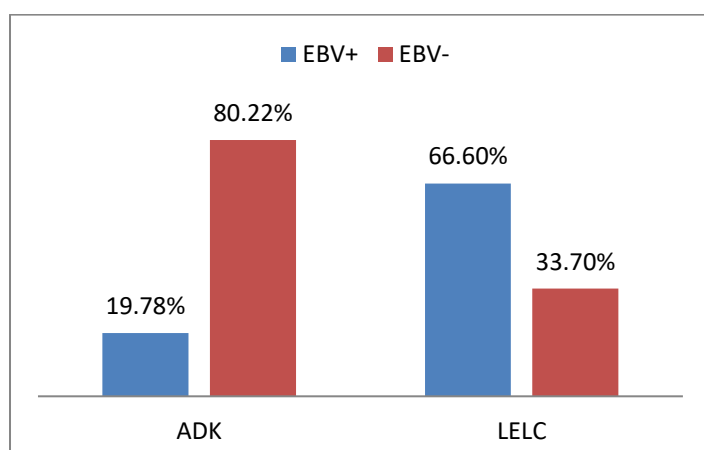


Figure 4.23 : Comparaison des pourcentages des cas de CG EBV+ et EBV- de type adénocarcinome gastrique (ADK) versus le type carcinome à stroma lymphoïde (LELC).

Chaque section histologique marquée à la fluorescence est comparée à sa paire adjacente, colorée à l'hématoxyline-éosine (HE), afin de faciliter l'interprétation et la localisation du signal. La révélation du marquage des EBERs et la visualisation de la fluorescence ont ainsi montré un signal fluorescent vert intense spécifique, localisé au niveau des noyaux des cellules tumorales et absent dans les cellules non-néoplasiques (Figure 4.24).

Parmi les 6 cas de dysplasies gastriques, 2 ont été positifs pour les EBERs, et tous les 10 cas non-néoplasiques présentant une simple gastrite se sont révélés être EBV-négatifs. Dans 3 cas de tissus non-néoplasiques, le signal a été observé dans un nombre limité de lymphocyte infiltrant, dispersés dans le stroma tumoral. Ces cas ont alors été classés EBV-négatifs, car l'infection des cellules épithéliale est absente (Figure 4.24D).

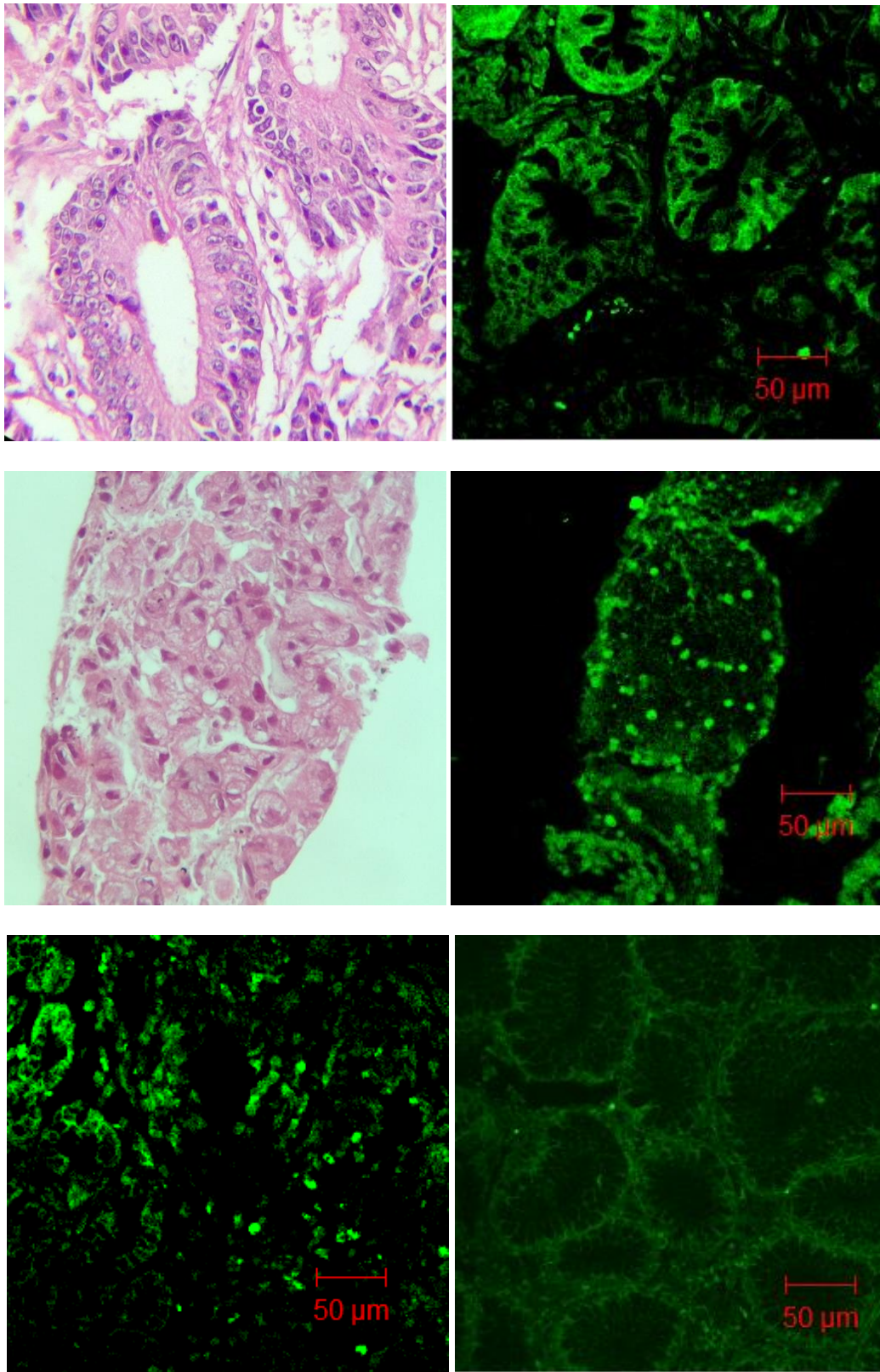


Figure 4.24 : Détection des EBERS par hybridation in situ en fluorescence dans le cancer gastrique. A1, B1) observation des coupes adjacente de respectivement A2 et B2 après coloration à HE Gx400. (A2) un adénocarcinome gastrique tubulaire bien différencié présentant un signal positif (vert) pour EBERS. B2) adénocarcinome peu différencié EBERS positif, C) adénocarcinome gastrique tubulaire bien à moyennement différencié EBERS positif. D) un tissu gastrique non-néoplasique EBERS négatif présentant quelques lymphocytes marqués en vert EBERS positifs indiquées par les flèches.

Le microscope utilisé pour l'observation des coupes est capable de réaliser une combinaison entre la technique de microscopie en fluorescence et la technique de contraste de phase. L'image de contraste de phase permet d'illustrer des détails morphologiques accentués du tissu étudié (Figure 4.25 A). Un fort agrandissement permet de distinguer les noyaux cellulaires qui apparaissent sombres dans le cytoplasme environnant (Figure 4.25 B2).

La combinaison des deux techniques donne une image sur l'observation simultanée de la fluorescence et de contraste de phase du même champ de vision. Cette image montre les noyaux cellulaires marqués à la fluorescence (Figure 4.25 B3). Cette technique nous a permis de bien visualiser une localisation nucléaire des EBERs dans les cellules tumorales.

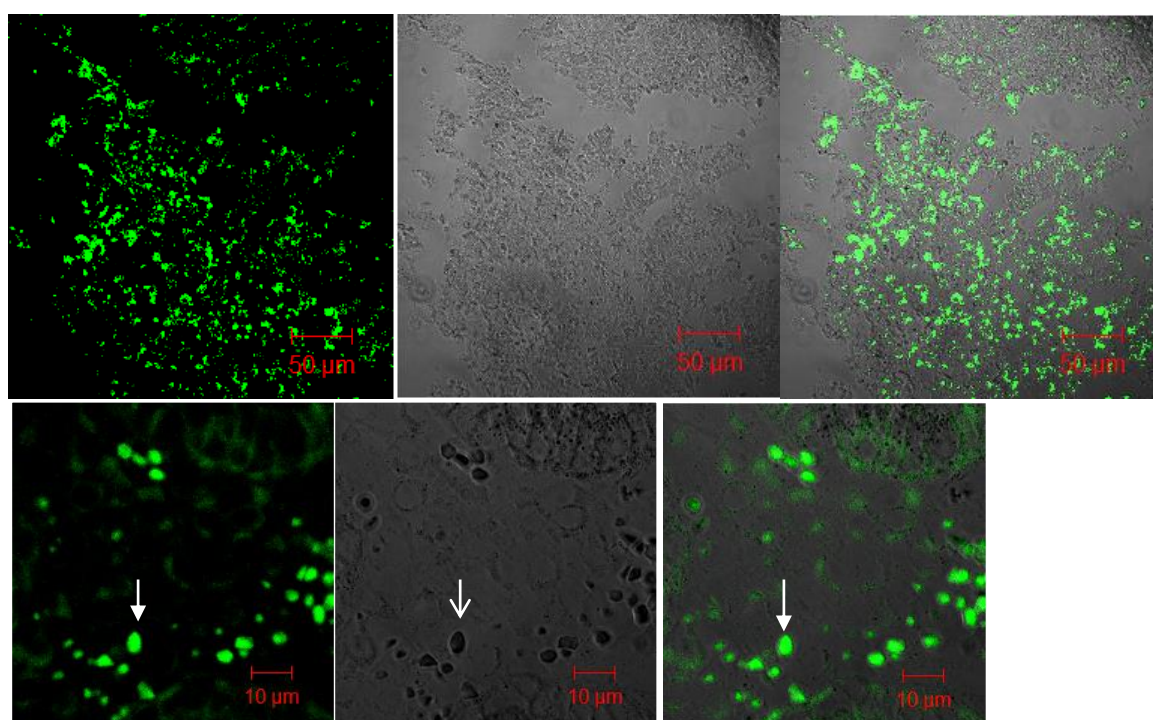


Figure 4.25 : Adénocarcinome gastrique peu différencié EBERs positif par FISH combiné avec la méthode de contraste de phase. A1) représente une prise de photos avec un éclairage fluorescent A2) illustre une image du même champ de vision en contraste de phase A3) représente une combinaison entre le marquage à fluorescence et de contraste de phase. B1,B2,B3) représentent un agrandissement de la même coupe représenté dans A. B2) l'image de contraste de phase montre les noyaux des cellules qui apparaissent sombre dans le cytoplasme environnant B3) la combinaison d'image du signal fluorescence et de contraste de phase montre une localisation nucléaire des EBERs dans les cellules tumorales.

4.1.1.3. Caractéristiques cliniques et pathologiques des cas de cancer gastrique EBV positifs

Les caractéristiques clinico-pathologiques des cas de cancer d'estomac EBV-positifs et des cas EBV-négatifs sont résumées dans le tableau 4.8. Les résultats sur l'expression virale ont démontré qu'il n'existe pas de corrélation entre la présence du virus et le sexe des patients. La fréquence des patients EBV-positifs de sexe masculin est plus élevée que celle des patients de sexe féminin, mais la différence n'est pas statistiquement significative ($p = 0.14$).

Par contre, une corrélation significative a été retrouvée entre la présence de l'EBV et l'âge des patients ($p = 0.029$) (Figure 4.26). En effet, les cas de CGaEBV sont plus fréquents chez les patients âgés entre 45 et 60 ans, par rapport aux autres tranches d'âge. En ce qui concerne le site anatomique de la tumeur, les cancers gastriques EBV-positifs situés dans l'antre de l'estomac représentent 27 %. Ils sont donc plus nombreux que les cas de CG EBV-positifs situés dans le fundus ou le corps (15.3 % et 21 % respectivement), mais la différence n'est pas significative ($p = 0.28$).

L'analyse des types histologiques basée sur la classification de Lauren a révélé qu'il n'existe pas de différence significative entre la fréquence des tumeurs EBV-positives de type diffus et celle des tumeurs EBV-positives de type intestinal (28 % vs 15 %, $p = 0.13$). En revanche, une corrélation significative a été observée entre les tumeurs EBV-positives et le degré de la différenciation tumorale ($p = 0.045$). Les tumeurs de grade peu différencié représentent 30 % et les tumeurs EBV-positives de grade bien et moyennement différencié sont respectivement d'une fréquence de 9.5 % et 15.8 %.

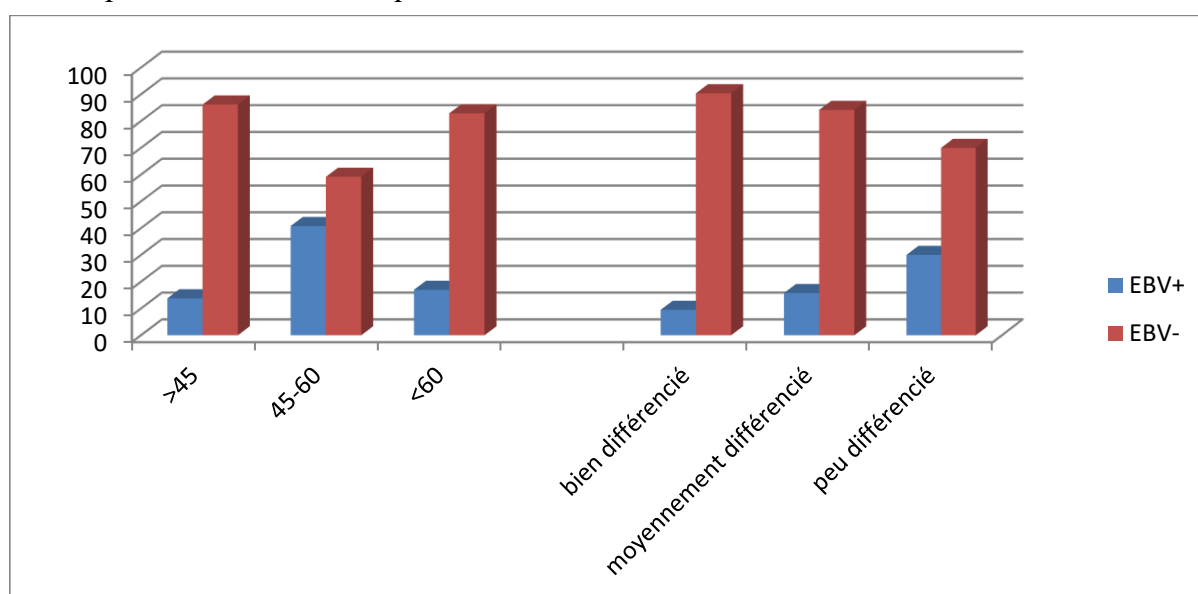


Figure 4.26: Répartition des cas EBV+ et EBV- selon les tranches d'âge et le degré de différenciation

Tableau 4.8. Les caractéristique cliniques et pathologiques des maladies EBV+ et EBV -

Caractéristiques cliniques	Totale (97)	Expression d'EBV		Valeur <i>p</i>
		Positif N(22) % (100)	Négatif N (75) % (100)	
Genre				
male	67	18 (26.8)	49 (73.2)	<i>P</i> =0.14
femelle	30	4 (13.3)	26 (86.6)	
Age				
> 45	29	4 (13.8)	25 (86.2)	<i>P</i>=0.029
45-60	27	11 (40.8)	16 (59.2)	
< 60	41	7 (17.0)	34 (82.9)	
Localisation				
fundus	26	4 (15.3)	22 (84.6)	<i>P</i> =0.28
corps	19	4 (21.0)	15 (79)	
antre	52	14 (27)	38 (73)	
Type Lauren				
intestinal	40	6 (15)	34 (85)	<i>P</i> =0.13
diffus	57	16 (28)	41 (72)	
Degré de différenciation				
bien	21	2 (9.5)	19 (90.4)	<i>P</i>=0.045
moyennement	19	3 (15.8)	16 (84.2)	
peu	57	17 (30)	40 (70)	

Les valeurs de *P* sont calculées par le test chi-2 ou le test exact de Fisher et sont considérés statistiquement significatives lorsque $P \leq 0,05$; les valeurs en gras indique les corrélations significatives.

La répartition des sous-types histologiques des cas de CG EBV positifs a montré que les tumeurs de type intestinal sont tous des adénocarcinomes tubulaires et il n'existait pas d'adénocarcinomes de type papillaire. Ainsi, parmi les tumeurs de type intestinal, l'implication de l'EBV est plus élevée chez les adénocarcinomes tubulaires modérément différenciés (tub2) par rapport aux adénocarcinomes tubulaires bien différenciés (tub1) (20 % vs 11.7 %) (Tableau 4.9).

En outre, parmi les tumeurs de types adénocarcinomes diffus, le sous-type solide peu différenciée (por1) et les adénocarcinomes à cellules isolées dites en bague à chaton (sig) présentent des proportions élevées parmi les autres types de CG EBV-positifs (34.8 % et 20 %), ceci à l'exception des cas de LELC qui représentent 66 % des cas.

Ces résultats signifient la préférence de l'infection virale des cas de CG présentant des caractères agressifs montrant par un faible degré de différenciations cellulaires. Cependant, en

raison du faible nombre de cas dans chaque groupe, l'analyse statistique n'a pas pu être effectuée.

La comparaison des fréquences des cas de CG EBV positifs réparties selon le sous-type histologique et le genre a montré que la préférence du genre masculin pour l'EBV est observée dans les deux types histologique intestinale (16.6% vs 10%) et diffus (35.1% vs 15%) ; et la plus haute fréquence a été observée chez les adénocarcinomes indifférenciés à cellules indépendantes (sig) caractérisés par leurs aspect agressif, ceci à l'exception des cas de CG de type lymphoépithelial (LELC) qui sont prouvés d'avoir une forte association avec l'EBV et ce qui est également observé dans notre série.

En conclusion, nous avons observé que les CGaEBV présentent des caractéristiques clinico-pathologiques particulières. Ils sont plus fréquemment retrouvés chez les patients âgés entre 45 à 60 ans et présentant un haut grade de différenciation tumorale.

Tableau 4.9 : Répartition des cas de CG EBV positifs selon le sous type histologique et le sexe.

Classification histologique	Total (EBV+)		Male (EBV+)		Femelle (EBV+)	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Intestinal	6/40	(15)	5/30	(16.6)	1/10	(10)
pap	0/3	(0)	0/3	(0)	0/0	(0)
tub1	2/17	(11.7)	2/12	(16.6)	0/5	(0)
tub2	4/20	(20)	3/15	(20)	1/5	(20)
Diffus	16/57	(28)	13/37	(35.1)	3/20	(15)
por1	8/23	(34.8)	6/16	(37.5)	2/7	(28.5)
por2	2/18	(11.1)	2/13	(15.4)	0/5	(0)
sig	2/10	(20)	2/5	(40)	0/5	(0)
LELC	4/6	(66)	3/3	(100)	1/3	(33)

Pap : adénocarcinome papillaire ; tub1 : adénocarcinome tubulaire bien différencié ; tub2 : adénocarcinome tubulaire moyennement à peu différencié ; por1 : adénocarcinome solide peu différencié ; por2 : non solide peu différencié ; sig : adénocarcinome en bague à chaton ; LELC : carcinome de type lymphoépithelial.

4.1.1.4. Détection des EBERs par Hybridation in situ chromogénique dans les tissus gastriques

La technique de CISH a été effectuée sur 10 échantillons de tissus gastriques, comprenant 9 cas confirmés d'adénocarcinomes et 1 cas non tumoral présentant une gastrite ; ces échantillons ont été au préalable utilisés pour la détection des EBERs par la FISH.

Sous microscopie optique, la CISH a révélé une coloration positive indiquant la présence d'EBERs. Le marquage prend une couleur bleu foncé/noir au niveau du site d'hybridation. Ici, le marquage a été localisé au niveau de tous les noyaux des cellules tumorales, et absent dans le tissu non tumoral (Figure 4.27).

Parmi les 9 cas d'adénocarcinomes étudiés, 6 cas ont été EBERs-négatifs et 3 cas ont été EBERs-positifs. Une concordance parfaite a été observée lors de la comparaison des résultats de la CISH et la FISH pour la détection des EBERs sur les mêmes tissus. En effet, tous les cas de CG révélés EBERs positifs par la FISH étaient également positifs par la CISH, de même pour les cas négatifs (Tableau 4.10).

La nouvelle méthode CISH présente une excellente spécificité et une précision similaire à la FISH, elle montre une sensibilité améliorée par rapport à cette dernière car elle donne plus de précision concernant la morphologie du tissu étudié. La technique de CISH démontre clairement l'expression nucléaire des EBERs, ce qui a été peu clair dans certains cas testés par la FISH (Figure 4.28). Cette technique a été appliquée afin de confirmer les résultats de la FISH dans la recherche de l'infection par l'EBV dans le CG et de comparer entre les résultats des deux techniques.

Tableau 4.10 : Comparaison entre les résultats de la FISH et la CISH pour la détection des EBERs sur 9 cas de CG.

Cas de cancer gastrique	EBERs (+)	EBERs (-)
FISH	3cas	6 cas
CISH	3cas	6 cas

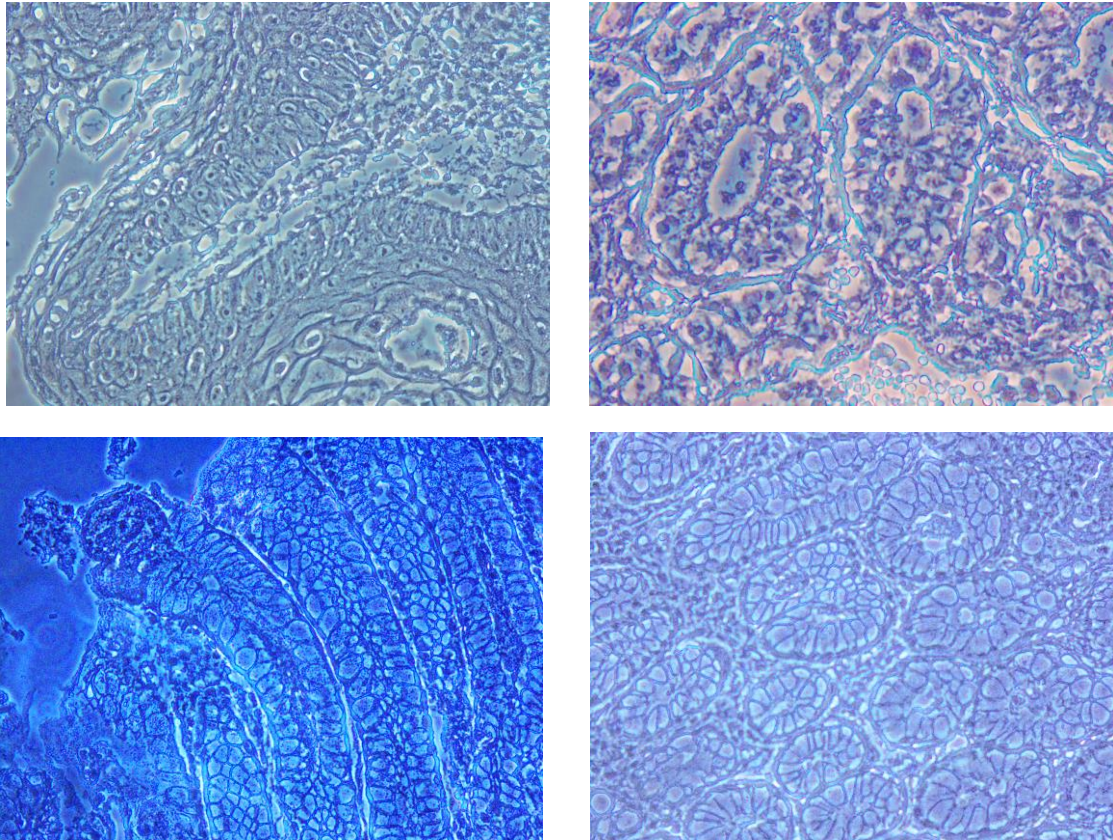


Figure 4.27: Détection de l'EBV par la technique CISH. A et B) adénocarcinomes gastriques EBERs positifs, les noyaux sont marqués en bleu foncé/ noir indiqués les flèches. C) adénocarcinome gastrique papillaire EBERs négatifs. D) tissu non tumorale gastrique EBERs négatifs. Les coupes sont observées au microscope optique Gx400.

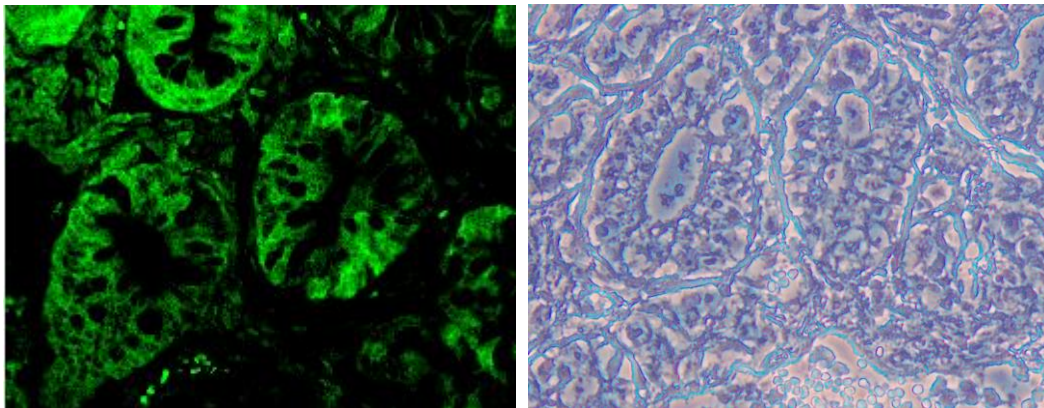


Figure 4.28 : Comparaison entre la détection des EBERs par la technique FISH (A) et la technique CISH (B) sur un cas d'adénocarcinome gastrique tubulaire bien différencié. Un signal positifs a été observé pour les EBERs en utilisant les deux méthodes CISH et FISH.

4.1.2. Discussion

4.1.2.1 Prévalence du virus d'Epstein-Barr dans le cancer gastrique en Algérie

Notre étude est la première ayant pour but principal de rechercher la présence de l'EBV dans le CG en Algérie. Nous avons analysé la prévalence de l'EBV dans une série de 97 cas de CG provenant de patients algériens, comparé à son expression dans des cas précancéreux gastriques et dans des cas non-tumoraux. Nous avons aussi confirmé la faisabilité de la technique FISH en utilisant une technique d'hybridation variante, la CISH. Enfin, nous avons précisé les caractéristiques clinico-pathologiques des cas de CGaEBV et nous avons analysé la signification biologique de la présence de l'EBV dans ce type de cancer.

Les résultats de la détection des EBERs par FISH dans la série d'échantillons étudiés indiquent qu'environ 22.7% des CG sont associé à l'EBV en Algérie. À l'exception des tumeurs à stroma lymphoïde qui ressemble aux tumeurs du nasopharynx et qui sont fortement associé à l'EBV, la prévalence de l'infection à EBV dans les adénocarcinomes gastrique est de 19.7% ; cette fréquence est l'une des fréquences les plus élevées au niveau mondial.

Le CGaEBV forme le plus large groupe de tumeur maligne associée à l'EBV. Il est présent dans le monde entier, avec des variations géographiques importantes (Takada, 2000). Selon les méta-analyses, la fréquence des infections à l'EBV dans le CG varie de 2 à 20%, avec une moyenne mondiale d'environ 10% (Xu et al., 2016 ; Wang et al., 2016(a)).

Les fréquences les plus élevées ont été observées aux Etats Unis (16%) (Shibata et Weiss., 1993 ; Gulley et al., 1996) et en Allemagne (18%) (Ott et al., 1994 ; Ryan et al., 2009) et les plus faible au Japon (6.9%) (Takada., 2000), en Chine (4.3%) (Camargo et al., 2011) et au Pérou (3.9%) (Yoshiwara et al., 2005). La seule étude réalisée en Afrique du Nord concerne la Tunisie, où les CGaEBV représentent 14.8% des CG (BenAyed-Guerfali et al., 2011).

En Algérie, le cancer de l'estomac est le cinquième cancer le plus répandu parmi la population, avec une incidence annuelle de 5,5/100 000 personnes. L'Algérie est ainsi considérée comme un pays à risque intermédiaire de survenue du CG (Hamdi-Cherif et al., 2014). D'autre part, l'Afrique du Nord est considérée comme une régions endémiques pour le NPC qui est fortement lié à l'EBV (Belkaid et al., 1995 ; Feng et al., 2007).

Dans ce travail, nous avons mis en évidence une haute fréquence des CGaEBV en Algérie, nous suggérons que ce phénomène pourrait être principalement lié à l'endémicité de l'infection à l'EBV dans cette région, comme dans le cas du NPC ; en effet, deux études menées en Chine ont indiqué que les CGaEBV sont plus fréquents dans les régions à forte incidence de NPC que dans celles à faible incidence, ce qui suggère que l'endémicité de

l'infection à l'EBV peut être un facteur de risque pour le CGaEBV (Hao et al., 2002 ; Boysen et al., 2009), et selon (Yanai et al., 1997) la persistance prolongée de l'EBV peut contribuer au développement du CG.

D'autre part, nous supposons que la présence d'autres facteurs pourraient être en rapport avec le taux d'association, relativement élevé, retrouvé dans notre série, ces facteurs peuvent être des expositions environnementales, le style de vie et/ou des prédispositions particulières dans la population soient génétiques, géographiques ou ethniques... ou également propre à la souche de l'EBV retrouvée dans cette régions. D'autres études intéressant un nombre important de tumeurs gastriques et provenant des différentes régions du pays sont nécessaires pour évaluer la prévalence des CGaEBV dans tous le pays.

En Algérie, les aliments traditionnellement conservés tels que la harissa, les fruits et les légumes marinés, la viande ou la graisse séchée et salée, le beurre rance et les fumées domestiques sont consommés en grande quantité. De même, on observe une importante consommation de tabac. Ces habitudes de vie ont déjà été signalées comme facteurs de risque pour le NPC (Feng et al., 2007 ; Feng et al., 2009). De plus, selon une étude japonaise, une alimentation riche en sel présente un facteur de risque pour les CGaEBV (Koriyama et al., 2005). Ceci a été également confirmé par une autre étude réalisée en Colombie (Campos et al., 2006). Il a aussi été démontré que le tabagisme est également un des facteurs de risque pour cette pathologie (Camargo et al., 2014). Ces études suggèrent donc que les habitudes alimentaires algériennes et le mode de vie ont probablement un effet important sur la fréquence élevée des CGaEBV observée dans notre étude.

Cependant, de plus amples investigations sont nécessaires afin de déterminer précisément les facteurs de risques liés à la survenue de la fréquence élevée de CGaEBV en Algérie, ceci en examinant les facteurs environnementaux et le style de vie des patients étudiés. Il sera également intéressant de déterminer la souche d'EBV impliquée dans les CG chez les patients algériens.

4.1.2.2 Validité des techniques d'étude

Burke et ses collaborateurs ont été les premiers à détecter la présence de l'EBV dans le carcinome indifférencié à stroma lymphoïde (LELC), en utilisant la technique de réaction de polymérase en chaîne (PCR) (Burke et al., 1990). Par la suite, plusieurs laboratoires ont adopté une approche par PCR pour la détection de l'EBV dans tous les types du CG.

La PCR est une technique sensible et spécifique pour la détection du génome viral, mais elle ne permet pas de déterminer l'origine cellulaire de l'ADN. Elle ne permet pas de savoir si

le virus est présent dans la population de cellules tumorales, ou dans les lymphocytes B porteurs de l'EBV qui s'infiltrant dans le stroma tumoral (Niedobitek et Herbst, 2001).

En effet, une analyse significative, visant la mise en évidence de l'EBV, nécessite non seulement la détection mais aussi la localisation du génome viral au niveau cellulaire. Cela n'est possible que par l'utilisation de techniques basées sur la morphologie du tissu comme l'ISH et l'immunohistochimie (IHC).

Les techniques d'ISH sont généralement utilisées pour la détection et la localisation du génome viral dans les coupes tissulaires, et les techniques immunohistologiques sont utiles à la distinction de la forme latente ou répliquative de l'infection par l'EBV, ainsi qu'à l'identification du type de latence virale dans les cas testés (Niedobitek et Herbst, 2001 ; Gulley et al., 2002).

Les premières tentatives de localisation de l'EBV de manière reproductible sur des coupes tissulaires ont été effectuées en utilisant l'ISH pour rechercher l'ADN viral (Niedobitek et Herbst, 1991). La plupart des travaux ont utilisé le fragment BamH1 clone du génome d'EBV comme sonde, car ce fragment est répété de 10 à 15 fois dans le génome viral (Jones et Griffin., 1983). Plus récemment, l'application de l'ISH à la détection des EBERs dans les tissus fixés au formol et enrobés en paraffine est devenue la méthode standard pour la détection de l'infection par l'EBV (Gulley, 2001; Herrmann et Niedobitek, 2003).

Dans ce travail, nous avons détecté la présence de l'EBV dans le CG par l'utilisation de deux dérivées de la technique d'ISH : l'hybridation in situ en fluorescence et l'hybridation in situ chromogénique. Ces deux techniques ont été utilisées pour détecter l'expression des EBERs dans les tissus tumoraux.

Les EBERs sont de petits ARNs nucléaires formés respectivement de 167 et 172 bases. Ils sont non-polyadénylés, non-codants. Ils sont exprimés dans toutes les formes connues de latence virale, avec un nombre de copies atteignant jusqu'à 10^7 copies par cellules (Rikinson et Kieff, 1996). En raison de leur abondance, ils représentent des cibles idéales pour la détection d'une infection à l'EBV.

Nos résultats ont permis de démontrer que la FISH peut être considérée comme une technique de référence pour la détermination du statut d'expression des EBERs, bien qu'elle ne permette pas une observation morphologique des tissus aussi détaillée que l'ISH classique, elle reste fiable pour la détection de l'EBV dans les cellules carcinomateuses gastriques.

La technique FISH a été utilisée en tant qu'outil de recherche depuis plus de 20 ans pour évaluer la présence ou l'absence de séquences spécifiques d'ADN sur les chromosomes (Pinkel et al., 1986). La méthode est devenue populaire comme outil de diagnostic en

oncologie clinique, et a été utilisée en tant qu'alternative ou en complément aux essais d'immunohistochimie dans la recherche de certains marqueurs du cancer (Slamon et al., 1987 ; Knoop et al., 2005).

La technique FISH a été utilisé avec succès pour la recherche de l'EBV et l'identification de cellules infectées dans le sérum de patients atteints de mononucléose infectieuse ou de maladie lymphoprolifératives (Stowe et al., 1998 ; Just et al., 1998 ; Kimura et al., 2009 ; Xing et al., 2011 ; Kawabe et al., 2012). D'autres travaux ont appliqué la FISH pour la recherche des EBERs sur des coupes de paraffine de tissus provenant de lymphome de Burkitt (Marziliano et al., 2005 ; Chuang et al., 2007 ; Chen et al., 2016(b)).

Une récente étude réalisée par Chen et ses collaborateurs a montrée l'efficacité de la FISH dans la détection de l'EBV sur des coupes tissulaires de NPC (Chen et al., 2010). Par la suite, Peng et ses collaborateurs ont testé la technique FISH pour la détection de l'expression des EBERs dans des échantillons de CG (Peng et al., 2011). Les résultats de cette étude démontrent que la FISH permet une sensibilité et une spécificité dans la mise en évidence de l'EBV.

Dans ce travail, nous avons utilisé la technique d'hybridation in situ chromogénique (CISH) afin de détecter l'expression des EBERs dans certains cas de CG. Cette technique a été utilisée dans le but de confirmer les résultats de la technique FISH et de tester sa validité dans la recherche de l'EBV. Les résultats de la CISH, ayant porté sur 9 cas d'adénocarcinomes gastriques, sont très proche des résultats obtenus par FISH : les EBERs ont été détectés dans 3 cas sur 9, et l'expression est négative dans le tissu non-tumoral. La CISH a permis de donner plus de détail sur la morphologie du tissu étudié, une comparaison entre cette technique et la FISH sur les mêmes coupes tissulaires confirme l'expression nucléaire des EBERs qui est parfois difficile à détecter par la FISH.

Bien que le nombre d'échantillons testés par CISH soit faible, la technique a néanmoins apporté des résultats satisfaisants et spécifiques, nous permettant de confirmer nos résultats par FISH, et d'apprécier la faisabilité de cette technique dans la détection de l'EBV sur des coupes tissulaires fixées au formol et enrobées en paraffine. Les deux techniques FISH et CISH semblent avoir les mêmes capacités à détecter les EBERs. Le dépistage du CGaEBV peut donc s'effectuer indifféremment avec l'une ou l'autre de ces techniques. Cependant, la CISH semble plus apte à être intégrée dans des laboratoires moins équipés, du fait de sa simplicité et de sa facilité d'exécution.

La CISH combine l'information génétique de la FISH avec la visualisation et l'interprétation de l'IHC (Di Palma et al., 2007) ; malgré que cette technique soit la technique

la plus utilisée pour la détection des EBERs (Gulley et Tang.,2008) la FISH donne des résultats très spécifiques et selon certains auteurs elle est plus sensible que la CISH dans la recherche d'une infection par l'EBV (Peng et al., 2011). Dans ce travail, nous avons utilisé des méthodes sensibles et spécifiques pour détecter l'EBV dans le CG qui peuvent être envisagée comme des outils de diagnostic de l'EBV en oncologie clinique.

4.1.2.3 Signification des caractéristiques cliniques et pathologiques des cas de cancer gastriques EBV-positifs

L'analyse de l'association entre les paramètres clinico-pathologiques et l'expression de l'EBV nous a permis de détecter une corrélation statistiquement significative entre la présence du virus dans le CG et deux paramètres : l'âge du patient, et le grade tumoral.

En effet, nous avons observé que les patients présentant un CGaEBV étaient âgés de 45 à 60 ans, ce qui correspond par ailleurs aux données présentées dans l'étude tunisienne (BenAyed-Gourfali et al., 2011) et une autre effectuée sur une série de la population chinoise (Wang et al. 2016(b)). Cependant, d'autres travaux ont au contraire déterminé que le CGaEBV peut survenir chez des patients relativement jeunes (Camargo et al., 2011 ; Lee et al., 2009(a)) ou au contraire, était prévalent chez des patients de plus de 50 ans (Herrera-Goepfert et al., 2005).

Cette hétérogénéité dans les résultats pourrait s'expliquer par certains facteurs de risque et habitudes de vie propres à chaque population, facteurs qui influenceraient le développement du CGaEBV. L'analyse de nos résultats suggère donc que, en Algérie, le CGaEBV peut se développer à partir de l'âge adulte, et atteint son apogée entre 45 et 60 ans, ceci via la réactivation de l'EBV chez des adultes présentant des facteurs de risques plus élevés par rapport à d'autres facteurs de tranches d'âge, le style de vie ou les facteurs professionnels (Campos et al., 2006 ; Kim et al., 2010).

Notre étude a également confirmé la présence d'une association significative entre l'expression de l'EBV et les CG de bas grade. Si peu d'études ont analysé ce paramètre, quelques publications rapportent des résultats en accord avec nos travaux (Shin et al., 1996 ; Camargo et al., 2011 ; BenAyad-Gourfali et al., 2011, Wang et al., 2016(a)). La présence de l'EBV principalement dans les cellules tumorales de CG de bas grade suggère un rôle potentiel de l'EBV dans la progression tumorale.

Nous n'avons pas observé ici de corrélation significative entre le sexe du patient et l'expression de l'EBV. Ceci est en accord avec les résultats de nombreuses études effectuées dans divers pays (Moritani et al., 1996 ; BenAyed-Gourfali et al., 2011 ; Yoshiwara et al.,

2005). Cependant, cette non-corrélation n'est pas un consensus général, puisque plusieurs études ont observé que les patients atteints de CGaEBV étaient d'une prédominance masculine (Corvalan et al., 2001 ; Murphy et al., 2009 ; Truong et al., 2009).

Concernant la localisation anatomique et le type histologique de la tumeur, nous n'avons pas trouvé d'association significative entre ces paramètres et l'expression de l'EBV dans notre étude. Cependant, deux méta-analyses ont précédemment suggéré que le CGaEBV se développe plus fréquemment dans la partie non-antrale de l'estomac (corps et fundus) (Lee et al., 2009 ; Murphy et al., 2012). Ces auteurs suggèrent que ces deux sites pourraient être un environnement préférentiel pour l'infection par l'EBV par rapport à d'autres sites anatomiques.

Au cours de notre étude, nous avons fréquemment observé des CGaEBV en localisation antrale. La localisation anatomique de ce type de tumeur a une grande importance pour la compréhension de la physiopathologie du virus dans la carcinogénèse des CGaEBV. Il est à noter que dans le cas d'une infection par *H pylori*, agent causal de la gastrite chronique, la métaplasie intestinale et le CG siègent fréquemment dans l'antra de l'estomac.

Le rôle de l'infection par *H pylori* dans les CGaEBV a été le sujet de plusieurs études, avec des résultats contradictoires. Si certains suggèrent qu'il n'existe aucune interaction entre le risque du CGaEBV et celui du CG lié à Hp (Luo et al., 2006 ; Nishikawa et al., 2014 ; de Souza et al., 2014), d'autres proposent que l'infection par l'EBV résulte en une interaction synergétique avec une infection par *H pylori*, induisant une inflammation sévère, et augmentant de ce fait le risque de progression vers un CG (Cárdenas-Mondragón et al., 2015). Il serait intéressant, dans une future investigation, d'étudier la présence simultanée de l'EBV et de Hp sur une large série de CG provenant de patients algériens surtout que l'infection par Hp dans notre région est très fréquente, cela va nous aider à comprendre la physiopathologie des CG associés à une infection par l'EBV.

D'autre part, certaines études ont rapporté la présence d'une association significative entre la positivité à l'EBV et le type histologique diffus (Koriyama et al., 2001; Alipov et al., 2005; Abdirad et al., 2007) ; alors qu'une seule étude a observé à contrario que le type intestinal était le plus fréquent dans le CGaEBV (Van Beek et al., 2004). Les tumeurs de type diffus sont caractérisées par leur faible différenciation cellulaire, et un comportement agressif.

Si plusieurs études ont pu prendre en considération le type morphologique de la tumeur, ceci n'a pas été possible au sein de notre étude, et ce dû au manque d'information fournie par les comptes rendus des examens d'anatomopathologie. Il est intéressant de noter que plusieurs études démontrent également la prédominance d'un aspect morphologique unique de la

muqueuse des tumeurs gastrique associées à l'EBV, appelé « motif en dentelle » (Liang et Zhou, 2016 ; Fukayama et Ushiku, 2011).

Parmi les cas de CG étudiés dans ce travail, les tumeurs gastriques à stroma lymphoïdes (LELC), caractérisé par une infiltration lymphoïde marquée, a présenté un taux de positivité plus élevé par rapport aux autres sous types. Ceci est en accord avec les résultats de plusieurs travaux qui ont démontré que près de 90% des LELC sont liés à l'EBV (Oda et al., 1993 ; Park et al., 2014 ; Min et al., 2015).

Notre étude montre que, dans la population algérienne, les CGaEBV présentent des caractéristiques clinico-pathologiques particulières : une survenue chez des malades âgés de 45 à 60 ans, et une association avec un grade de tumeur avancé. En désaccord avec une partie de la littérature, nous n'avons pas ici trouvé de différences dans la distribution de l'EBV chez les hommes/femmes, dans la partie proximal /distale de l'estomac, et dans le type histologique diffus / intestinal.

Ces variations entre nos résultats et les études précédentes peuvent s'expliquer par la contribution des facteurs de risque locaux dans la pathogenèse de l'EBV, tels que le mode de vie, les habitudes alimentaires et l'exposition environnementale. Il est également possible que la taille et les caractéristiques de la cohorte étudiée aient influencé nos résultats.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il existe une différence régionale concernant les caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints de CGaEBV donnée par la littérature. Il est bien de noté que les caractéristiques observées dans les cas de CGaEBV dans notre série sont très proche de celles observées dans une étude tunisienne, qui était la seule effectuée en Nord d'Afrique. Cela nous laisse suggérer d'une part, que cette différence peut être influencée par l'implication de certains facteurs de risques locaux sur la présence et le rôle de l'EBV dans cette maladie. La nouvelle classification des CG définit les CGaEBV comme un sous type caractérisé par des anomalies génétiques et épigénétiques particulières qui déterminent un phénotype spécifiques de cette pathologie (Cancer Genome Atlas Recherche Network., 2014). Nous pouvons dire alors que les caractéristiques clinico-pathologiques observées dans nôtres études reflètent probablement la présence d'anomalies génétiques et épigénétiques particulières propres à cette régions, et que la pathologie moléculaire des CGaEBV en Nord d'Afrique pourrait être différente de celle observée dans d'autres régions du monde. Cela ouvre de nouvelles voies de recherche dans ce domaine.

4.1.2.4 Signification biologique de la présence de l'EBV dans le cancer gastrique et dans les lésions précancéreuses

Dans notre étude, nous avons observé que l'expression des EBERs est localisée au niveau du tissu tumoral et absente dans le tissu non néoplasique. La présence du génome viral dans les cellules tumorales gastriques soulève la possibilité d'une contribution de l'EBV à la transformation néoplasique. Cependant, selon Shibata et Weiss., (1992) ceci seule ne fournit pas une preuve suffisante pour un tel rôle, la preuve supplémentaire sera bien la différence dans la prévalence de l'EBV dans le tissu cancéreux gastrique et le tissu non-cancéreux ce qui a été prouvé dans notre travail.

Malgré l'hétérogénéité des plans d'études et des résultats, une analyse de la littérature concernant la détection de l'EBV dans le CG via l'utilisation de méthodes standards comme l'ISH suggère que la plupart des tissus non-cancéreux adjacents à la tumeur, ou provenant de patients sains ou souffrant d'une simple gastrite, sont EBV-négatifs (Shibata et Weiss, 1992 ; Zur Hausen et al., 2004 ; Ryan et al., 2009 ; Truong et al., 2009 ; Bae et Kim, 2016). Seules deux études rapportent l'observation de l'expression de l'EBV dans les cellules épithéliales normales adjacentes (Fukayama et al., 1994 ; Shousha et al., 1994).

La recherche des EBERs dans les tissus non néoplasiques nous a permis de démontrer l'absence d'expression dans toutes les cellules épithéliales normales. Cependant, dans certains cas quelques lymphocytes circulants dans le stroma tumoral ont été révélés positifs pour l'EBV. Des observations similaires ont été également signalées dans les études de Ryan et al., (2009) et Ryan et al., (2012), selon ces auteurs la présence de quelques lymphocytes positifs pour les EBERs ne signifie pas que le tissu est infecté par l'EBV car les cellules épithéliales ne le sont pas. Ainsi nous pouvons dire que la présence de l'EBV dans le tissu gastrique tumorale et son absence dans le tissu non tumoral témoigne un rôle causal de ce virus dans le développement des CGaEBV ; de plus, cette forte expression des EBERs dans les cellules tumorales prouve que ces molécules sont importantes pour la transformation maligne et le développement de la tumeur.

Il est établi que la prolifération de l'EBV est monoclonale dans le CG comme dans le NPC. Ceci a été déterminé suite à l'analyse par Southern blot de la présence d'épisomes d'EBV monoclonaux dans toutes les cellules tumorales gastriques (Zur Hausen et al., 2004 ; Thorley-Lawson, 2005). La prolifération monoclonale de l'EBV indique donc qu'une seule cellule épithéliale infectée par l'EBV peut être progénératrice d'une infection de tout le tissu épithélial.

Ainsi, certains auteurs ont conclu que la présence uniforme des EBERs dans les cellules tumorales, et leur absence dans les cellules épithéliales normales environnantes et la prolifération monoclonale de l'EBV dans les cellules gastriques tumorales, sont deux preuves suffisantes pour démontrer que l'EBV est impliqué dans la carcinogenèse gastrique (Akiba, 2008 ; Shinozaki-Ushiku et al., 2015(a)).

Cette conclusion renvoie naturellement à la question suivante : à quel stade l'infection des cellules épithéliales gastriques par l'EBV est-elle établie ? Est-elle un événement précoce ou tardif de la carcinogénèse?

Le mécanisme ou l'itinéraire exact par lequel l'EBV pénètre dans les cellules épithéliales de l'estomac est inconnue. Dans notre travail, nous avons observé une expression des EBERs dans la muqueuse gastrique précancéreuse dysplasique. Ceci peut signifier que l'EBV infecte l'épithélium gastrique avant la rétro différenciation cellulaire et contribue probablement dans les premières étapes de ce processus. Bien que nos résultats soient en accord avec ceux de certaines études précédentes (Shibata et Weiss, 1992 ; Gulley et al., 1996 ; Herrera-Goepfert et al., 2005), cette observation est néanmoins controversée. En effet, des chercheurs ont examiné l'expression des EBERs dans le CG et dans les tissus précancéreux (métaplasie intestinale ou dysplasie) (Ott et al., 1994 ; Selves et al., 1996 ; Zur Hausen et al, 2004) ; ils ont alors démontré que cette expression est limitée aux cellules néoplasiques et est absente dans les lésions précancéreuses. De ce fait, ces auteurs ont suggéré que l'EBV infecte l'épithélium gastrique après la transformation néoplasique, et joue un rôle dans les stades tardifs du processus cancérigène multi-étapes.

Par ailleurs, tous les échantillons non-néoplasique présentant une gastrite de notre série se sont révélés être EBERs-négatifs, ceci indique que l'EBV n'est pas impliqué dans la pathogénèse de l'inflammation gastrique, ce qui a été également conclu par d'autre étude (Hungermann, et al., 2001 ; Ryan et al., 2009 ; Ryan et al., 2012). Nous avons néanmoins parfois observé la présence de quelques lymphocytes dans le stroma tumoral marqués à la fluorescéine, cette observation nous laisse suggérer que ces lymphocytes EBV-positifs forment un réservoir pour le virus, selon (Shinozaki-Ushiku et al (2015(a) ; Martinez-Lopez et al., 2014) la gastrite chronique pourrait augmenter les risques d'interactions entre les cellules épithéliales gastriques et les lymphocytes B porteurs d'EBV.

Sur la base de nos résultats, nous supposons que suite à l'accumulation d'autres facteurs déclenchant la formation d'une tumeur (exposition à certains facteurs de risque), la gastrite chronique atrophique peut évoluer vers une métaplasie intestinale, puis vers une dysplasie. C'est alors que le virus peut faire son entrée dans les cellules épithéliales via les lymphocytes

EBERs-positifs qui se trouvent dans le stroma tumoral. La suite de la cascade des étapes de la carcinogénèse orchestrée par l'EBV peut alors commencer.

Donc nous proposons que l'infection par l'EBV précède la transformation maligne, et que les lésions dans la muqueuse gastrique représentent un environnement favorable pour l'EBV, tandis que les tissus normaux ne permettent pas facilement la multiplication de ce virus.

Ainsi, les observations suivantes renforcent notre hypothèse ; (i) plusieurs études rapportent que les patients présentant un CGaEBV sont exposés plus fréquemment à la poussière de bois et aux poussières de métal, exposition qui provoque des lésions de la muqueuse gastrique (Campos et al., 2006 ; Koriyama et al., 2005). (ii) une forte prévalence des signaux EBERs (20 à 30%) a été observée dans les cancers du moignon gastrique, qui sont par définition des cancers qui se développent après une gastrectomie partielle (Zur Haussen et al., 2004 ; Chang et al., 2000). (iii) la positivité de l'EBV a été deux fois plus fréquente chez des cas de CG associé à une anémie pernicieuse par rapport à d'autres cas de CG, l'inflammation chronique et l'absence d'acide gastrique causée par l'anémie peuvent provoquer des lésions de la muqueuse gastrique et influencer la probabilité d'infection par l'EBV (Boysen et al., 2011).

L'ensemble de ces arguments tend à suggérer une corrélation entre le risque de développer un CGaEBV et les facteurs liés à la dégradation de la muqueuse de l'estomac. Ceci suggère donc que de tels dommages de la membrane gastrique peuvent favoriser une infection par l'EBV.

Il a été établi que les récepteurs de l'EBV (CD21) sont absents des cellules épithéliales gastriques (Yoshiyama et al., 1997 ; Luo et al., 2004), ce qui explique l'absence d'expression détectable de l'EBV dans l'épithélium gastrique non néoplasique. Selon Yoshiyama et al., (1997) certaines modifications bénignes de la muqueuse gastrique associées à un risque accru de cancer de l'estomac, telles qu'une atrophie gastrique, une métaplasie intestinale chronique ou une dysplasie, peuvent induire l'expression d'un récepteur à l'EBV différent de CD21, et par conséquent permettre à l'infection de précéder la transformation.

D'autre part, plusieurs études ont démontré que le sérum des patients atteints d'un CGaEBV présente des taux élevés d'anticorps anti-EBV (Shinkura et al., 2000 ; Chen et al., 2015). De plus, chez les patients atteints de dysplasie gastrique, les taux de ces anticorps sont plus élevés que ceux des patients atteints d'une simple gastrite (Shatter et al., 2008). Ceci pourrait indiquer que la réactivation de l'EBV s'effectue à un stade précoce de la carcinogénèse gastrique.

Encouragés par les différents travaux supportant un rôle étiologique pour l'EBV, nous suggérons que l'EBV réactivé infecte précocement les cellules dysplasiques gastriques, infection suivie d'une expansion clonale ultérieure des cellules tumorales EBV-positives. Le virus peut alors jouer un rôle dans les stades précoces de la transformation maligne des cellules épithéliales. Cependant, il est clair que la présence de l'EBV et son rôle dans l'oncogenèse du cancer de l'estomac nécessite d'être explorés plus amplement.

4.2 Résultats et discussion de l'étude : Étude de l'infection latente de l'EBV dans le cancer gastrique. Détection de l'expression de LMP-1

4.2.1 Résultats

Afin de détecter l'expression de LMP-1 dans le tissu tumoral gastrique, nous avons appliqué les deux techniques l'IF et l'IHC sur 22 cas de CG testés EBV positifs par la FISH et ce en utilisant deux anticorps monoclonaux différents. Un tissu non néoplasique gastrique et un témoin positif correspondant à un lymphome Hodgkinien ont été utilisés pour les deux techniques afin de comparer les résultats. Par la suite, et afin de rechercher la présence simultanée de LMP-1 et EBERs dans les tissus tumoraux gastriques, nous avons utilisé la technique de double marquage à IF et FISH simultanément sur le même tissu.

4.2.1.1 Détection de LMP-1 par immunofluorescence et double marquage à immunofluorescence

Parmi les 22 cas de CG EBERs-positifs, l'analyse par IF des échantillons a permis de détecter LMP-1 dans 8 cas (36.4%). Sous microscope à fluorescence, les sites de marquage de LMP-1 présentent un signal fluorescent vert spécifique et intense, localisé au niveau de la majorité des cellules tumorales. L'analyse du tissu non-néoplasique montre une absence de signal correspondant à LMP-1 ainsi le témoin positif correspondant à un lymphome de Hodgkin positif pour LMP-1. (Figure 4.29).

Une double coloration par IF de LMP-1 et de la cytokératine a été effectuée sur cinq cas de CGaEBV, ceci dans le but de déterminer le phénotype des cellules exprimant LMP-1, car le marquage spécifique pour la cytokératine indique sa localisation au niveau des cellules épithéliales. Les échantillons sélectionnés présentaient un bas grade tumoral ce qui nous a permis de bien visualiser la structure de l'épithélium. Sous microscope à fluorescence, le marquage LMP-1 apparaît en rouge vif, et la cytokératine en vert intense, les noyaux cellulaires sont colorés en bleu (Figure 4.30). La superposition des images laisse apparaître un marquage jaune qui dénote la co-localisation de LMP-1 et de la cytokératine dans les cellules

tumorales gastriques. Ceci indique que LMP-1 est localisée au niveau des cellules épithéliales (Figure 4.30).

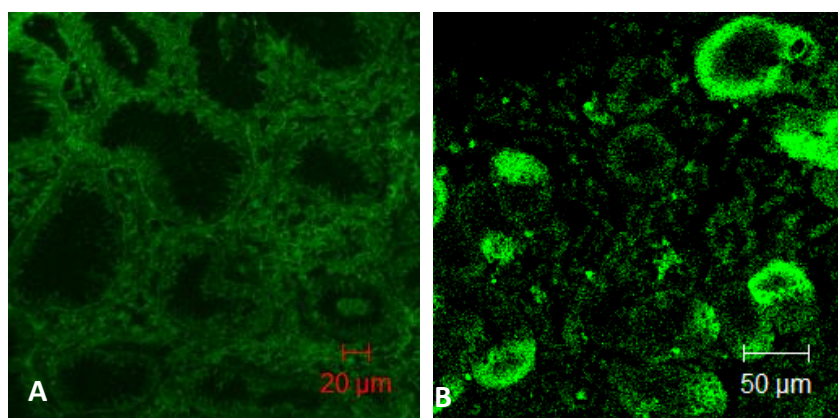


Figure 4.29: Analyse d'expression de LMP-1 par immunofluorescence sur coupe de paraffine de tissu épithéliale gastrique (A) un signal négatif a été observé dans un tissu non-néoplasique gastrique (B) un signal positif a été observé dans un cas d'adénocarcinome gastrique bien différencié.

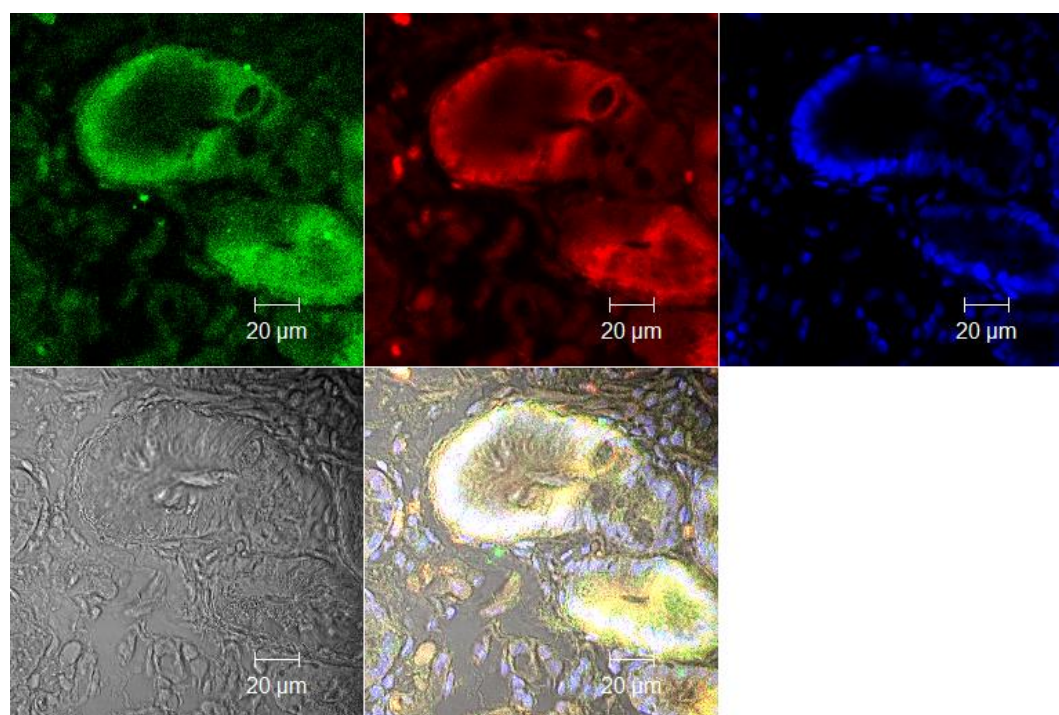


Figure 4.30 : Double coloration à immunofluorescence pour LMP-1 et la cytokératine dans un adénocarcinome gastrique bien différencié A) la cytokératine est marquée en couleur verte B) le marquage de LMP-1 est en couleur rouge. C) les noyaux sont contre coloré avec le DAPI qui apparaissent en couleur bleu. D) représente l'image en contraste de phase E) La superposition des images montre un marquage jaune confirmant une co-localisation de la LMP-1 et la cytokératine au niveau du cytoplasmique et membranaire des cellules épithéliales tumorales.

4.2.1.2 Détection de LMP-1 par immunohistochimie

Une concordance parfaite a été observée entre les résultats de l'IF et ceux de l'IHC. L'analyse des 22 cas de CG EBV-positifs par IHC a révélé que les 8 cas de CG LMP-1-positifs par IF étaient également positifs par IHC, et les 14 cas LMP-1-négatifs étaient également négatifs par IHC. L'IHC fournit plus de détails morphologiques sur le tissu étudié que l'IF. Nous avons ainsi pu observer que l'expression de LMP-1 est localisée au niveau membranaire et cytoplasmique dans toutes les cellules malignes, et est absente dans les cellules normales. Le témoin positif, qui est un cas de lymphome Hodgkinien, a donné un marquage positif pour LMP-1 (Figure 4.31).

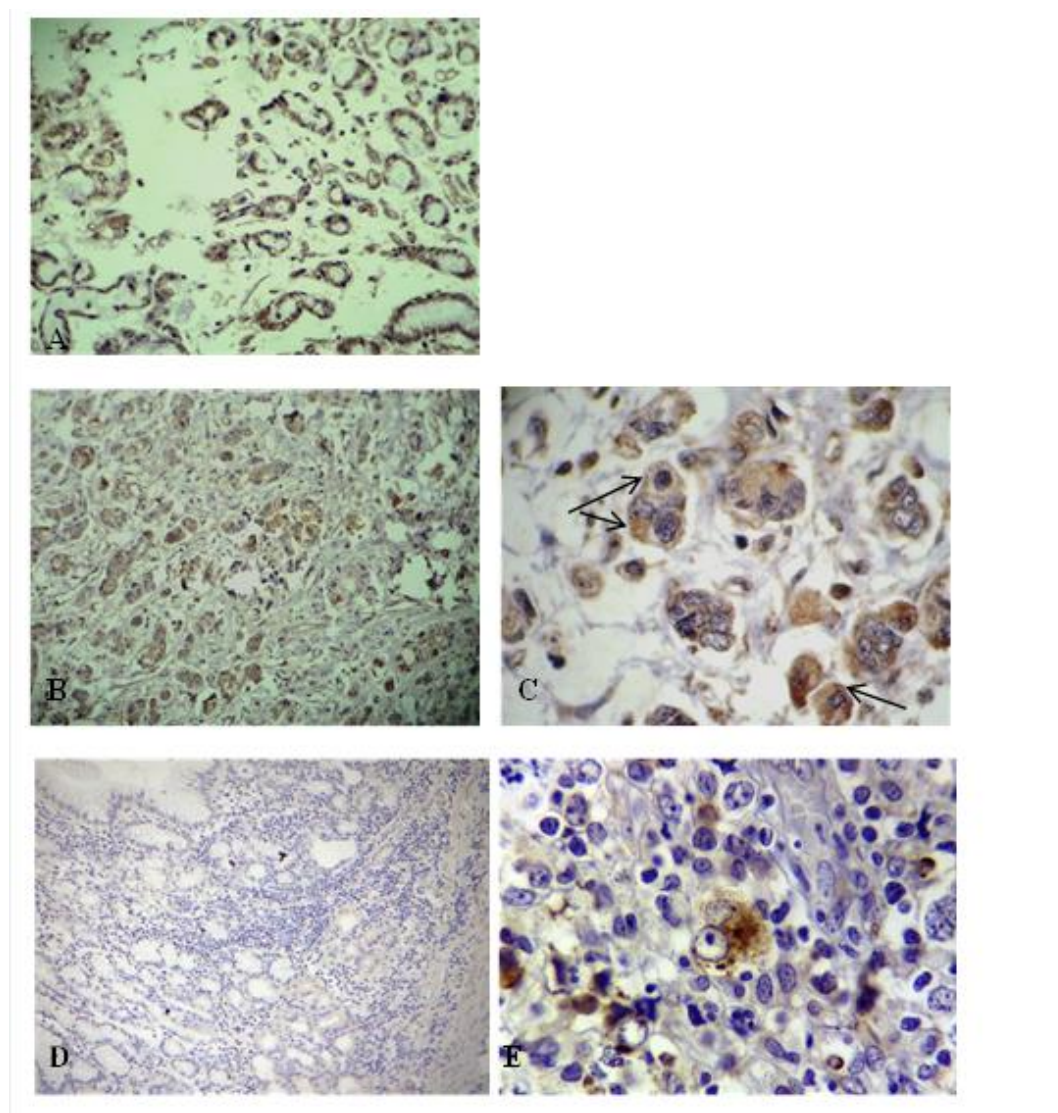


Figure 4.31: Détection de LMP-1 par immunohistochimie sur des coupes de tissus d'épithélium gastrique. A) adénocarcinome bien différencié LMP-1 positif. B) adénocarcinome peu différencié LMP-1 positif. C) un agrandissement de la coupe B démontre une expression membranaire et cytoplasmique de LMP-1 dans les cellules tumorales marqué par les flèches. D) un signal négatif observé dans le tissu non néoplasique gastrique. E) le contrôle positif correspondant à un lymphome de Hodgkin présente un signal positif pour LMP-1 sur ses cellules de Reed Stenberg. Grossissement (A,B,D x 400) et (C, E x1000).

D'autre part, l'analyse des caractéristiques pathologiques des 8 cas EBV-positifs et LMP-1 positifs nous a permis de constater que 6 cas sur 8 (75%) sont des adénocarcinomes peu différenciés. L'expression de LMP-1 est donc significativement associée avec le degré avancé de la tumeur ($p=0.032$). En revanche, nous n'avons pas observé de relation significative entre l'expression de LMP-1 et d'autres paramètres tels que le genre, l'âge, la localisation tumorale ou le type histologique de la tumeur.

4.2.1.3 Recherche simultanée d'EBERs et LMP-1 par double marquage à immunofluorescence et hybridation in situ en fluorescence :

La technique de double marquage par IF pour LMP-1 et FISH pour EBERs a été réalisée sur 15 cas de cancer gastrique. Dans cinq cas, le double marquage a été positif pour EBERs et LMP-1 simultanément et dans dix cas le double marquage a été négatif pour EBERs et négatif pour LMP-1. Également, nous n'avons pas observé des cas de CG EBERs positifs et LMP-1 négatifs ou même le contraire LMP-1 positifs et EBERs négatifs, les résultats sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 4.11 : Effectifs des cas de CG après le double marquage pour EBERs et LMP-1

Cas de cancer gastrique	EBERs (+)	EBERs (-)
LMP-1 (+)	5 cas	0 cas
LMP-1 (-)	0 cas	10 cas

L'expression positive de LMP-1 est marquée en coloration fluorescente rouge alors que l'expression des EBERs est marquée en coloration fluorescente verte, les noyaux cellulaires sont contre coloré par le DAPI donnant un marquage bleu.

L'observation sous microscope en fluorescence a révélé que le signal positif de LMP-1 est en grand partie identique à celui des EBERs au niveau des cellules tumorales, (Figure 4.32). Parmi les échantillons sélectionnés pour cette analyse, un cas était de type histologique tubulaire bien différencié dont la structure des glandes est conservée à un certain degré. L'expression des deux marqueurs EBERs et LMP-1 dans cet échantillon a été bien visualisé dans les cellules épithéliales tumorales glandulaire (Figure 4.32 A).

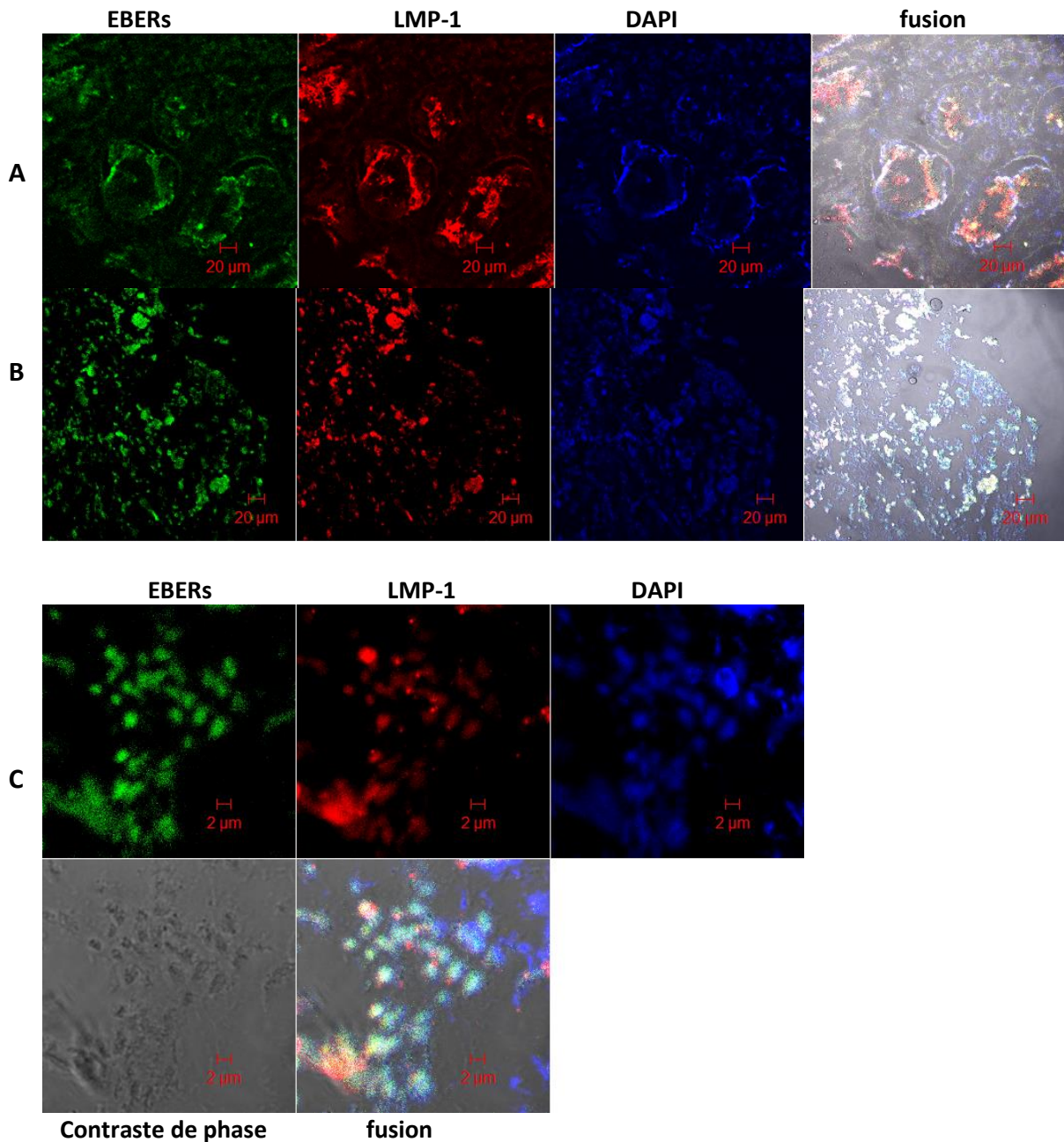


Figure 4.32 : Double coloration par IF pour LMP-1 et FISH pour EBERs sur des coupes en paraffine de tissus tumoraux gastriques, montre en (A) un signal positif pour EBERs en vert, un signal positif pour LMP-1 en rouge, et une contre coloration des noyaux par le bleu du DAPI dans un adénocarcinome gastrique bien différencié. La fusion des signaux fluorescence montre une localisation nucléaire des EBERs (signale jaune représenté par une flèche blanche) et une localisation cytoplasmique de LMP-1 (flèche noire) au niveau des cellules épithéliales tumorales. La double coloration montre en (B) un signal positif pour les deux marqueurs EBERs et LMP-1 simultanément dans un d'adénocarcinome peu différencié, en plus fort agrandissement représenté en (C) le marquage des EBERs apparaît au niveau nucléaire (flèche blanche) et LMP-1 au niveau cytoplasmique (flèche noire).

Avec la double coloration par IF et FISH sur des coupes histologiques fixées au formole les détails morphologiques du tissu ne sont pas facilement observés. Néanmoins, l'utilisation de la microscopie à fluorescence combinée à la technique de contraste de phase a permis de bien visualisé une localisation nucléaire des EBERs et membranaire de LMP-1 au niveau des cellules gastriques tumorales. La superposition des images montre des zone de fusion du signale vert des EBERs et le bleu du DAPI qui clore les noyaux, par contre le signale rouge de LMP-1 est localisé dans le cytoplasme des cellules.

4.2.2 Discussion

4.2.2.1 Détection de LMP-1 par immunofluorescence, double immunofluorescence et immunohistochimie

Dans cette étude, l'utilisation des techniques d'IF et d'IHC (utilisant deux anticorps anti-LMP-1 différents) nous a permis de détecter cette protéine dans 8 cas sur 22 (36.4%) des cas de CG EBV-positifs. D'un point de vue cellulaire, LMP-1 a été localisée au niveau membranaire et cytoplasmique. Au niveau tissulaire, la double coloration à IF pour LMP-1 et la cytokératine a révélé une co-localisation qui signifie que les cellules infectées exprimant la protéine LMP-1 sont des cellules épithéliales malignes.

Cette localisation cytoplasmique et membranaire de LMP-1 observée au niveau des cellules tumorales gastrique a été également rapportée par d'autres études effectuées sur plusieurs type de malignité associé à l'EBV comme dans le NPC (Wang et al., 2016(b)) et dans les lymphome de Hodgkin (Hashmi et al., 2017). Certains travaux précédents ont rapporté que LMP-1 est sécrétée sous forme d'exosomes dans le cytoplasmes des cellules épithéliales, puis conduite ultérieurement vers la membrane cytoplasmique afin de former la structure transmembranaire qui lui est spécifique (Duckers et al., 2000., Houali et al., 2007). Ces auteurs rajoutent que LMP-1 peut être sécrété dans le compartiment extracellulaire afin d'activer plusieurs voies de signalisation, dont l'effet est de développer un microenvironnement tumoral. Cette protéine a aussi été retrouvée associée aux exosomes dans le sérum de patients atteints de NPC, et de souris porteuses de tumeurs (Denzer et al., 2000 ; Houali et al., 2007). Il semble que LMP-1 ait une activité mitogène, observée sur des cultures cellulaires, ainsi qu'une activité suppressive vis à vis du système immunitaire (Dukers et al., 2000 ; Gutzeit et al., 2014 ; Aga et al., 2014).

La localisation cytoplasmique et membranaire de LMP-1 observée dans notre étude nous laisse suggérer que cette protéine peut être également nécessaire pour le développement du microenvironnement tumoral dans les CGaEBV et à son maintien.

Plusieurs études ont été réalisées pour rechercher la présence de LMP-1 dans les tumeurs associées à l'EBV et son action sur les cellules infectées. Cette protéine a été retrouvée dans plusieurs types de malignité associées à l'EBV comme les tumeurs du nasopharynx (Dawson et al., 2012 ; Rosales-Pérez et al., 2014 ; Kim et al., 2006) ; les lymphomes de Burkitt (Lei et al., 2015) et les lymphomes de Hodgkin (Chang et al., 2017 ; Hashmi et al., 2017).

LMP-1 a été considéré comme l'oncogène majeur de l'EBV, elle est capable d'immortaliser les lymphocytes B infectés par l'EBV in vitro (Kaye et al., 1993 ; Rowe et al., 1994 ; Dawson et al., 2008) et de transformer les cellules épithéliales en cellules malignes par plusieurs action dont principalement l'induction de l'échappement de l'apoptose et l'inhibition de la différenciation cellulaire (Dawson et al., 1990; Fahraeus et al., 1990 ; Wang et al., 1985 ; Sun et al., 2015). Ainsi, la détection de l'expression de la protéine LMP-1 dans les tissus tumoraux gastriques infectés par l'EBV, nous laisse suggérer que le pouvoir oncogénique et transformant de ce virus dépend de l'expression de l'oncogène LMP-1.

D'autre part, dans cette étude, l'analyse des caractéristiques clinico-pathologiques des cas de CG EBV-positifs et LMP-1-positifs nous a permis de constater que 6 cas sur 8 (75%) sont des adénocarcinomes à faible degré de différenciation cellulaire. L'association de l'expression de LMP-1 avec le degré de différenciation des cellules tumorales a été également observé par certaines études effectuées sur des échantillons du NPC (Wang et al., 2016(b)) et des échantillons de lymphomes de Burkitt (Chang et al., 2017; Hashmi et al., 2017). Ces résultats suggèrent un rôle important de LMP-1 sur la diminution de la différenciation cellulaire pendant la tumorigénèse gastrique, rôles déterminés précédemment in vitro dans les cellules épithéliale (Dawson et al., 1990; Wang et al., 1985).

L'EBV persiste dans l'organisme d'une façon latente et en fonction des gènes exprimés, le modèle de latence est définit (type I, II ou III). Dans la grande majorité des cancers associés à l'EBV, le virus exprime la latence de type II ou III, durant lequel LMP-1 est exprimée. Le lymphome de Burkitt exprime uniquement EBNA et plusieurs ARN non codants BART et EBER (latence I), alors que certains lymphomes de Hodgkin, Les carcinomes nasopharyngés et les lymphomes des cellules T/NK, expriment EBERs, BARTs, EBNA1, LMP1 et LMP2 (latence II) En plus des gènes de latence II, EBNA2, EBNA3 et EBNA-LP sont également exprimés dans les LCL transformées in vitro par EBV et dans les lymphoproliférations des sujets immunodéprimés (latence III) (Tsao et al., 2015).

La forte expression de LMP-1 détectée dans nos échantillons de CG nous laisse suggérer que la latence virale dans cette pathologie et de type II ou III. Il reste a déterminé l'expression

des autres protéines comme l'EBNA-2 EBNA3 et EBNA-LP afin de confirmer le type de latence dans les CGaEBV.

La présence de LMP-1 dans les CGaEBV a toujours été sujet de controverse. Si certains auteurs ont confirmé la présence de LMP-1 dans leurs échantillons de CG EBV-positifs par IHC (Kida et al., 1993; Shin et al., 1996; Harn et al., 2005; Wang et al., 2008 ; Wang et al., 2016), d'autres ne l'ont pas détectée dans leurs séries (Truong et al., 2009; Uozaki et Fukayama, 2008). Selon ces derniers auteurs, l'absence de la protéine LMP-1 suggère qu'elle n'est nécessaire ni au développement, ni au maintien de la tumeur. Les travaux de Li et ces collaborateurs ont permis de démontrer que dans des lignes de cellules gastriques et des échantillons de tumeurs gastrique infectés par l'EBV, les promoteurs des gènes codant pour de LMP-1,-2A et -2B sont hyperméthylés et l'expression de ces trois protéines est réprimée, le groupe rajoute que l'expression de LMP-1 a été restaurée avec la déméthylation du promoteur (Li et al., 2016). Les résultats de ce groupe nous poussent à étudier le profil de la méthylation du promoteur de LMP-1 dans les cas de CGAEBV de notre cohorte.

Cependant, certaines études ont observé une forte expression des ARNm encodant LMP-1 par RT-PCR, alors que l'analyse IHC reflète une expression protéique faible ou négative (Lee et al., 2004; Zhu et al., 2013). D'autres auteurs proposent alors que cette protéine pourrait intervenir dans les stades précoces du développement tumoral, et par la suite être négativement régulée, via un mécanisme inexpliqué.

D'autres formulent l'hypothèse que l'absence de LMP-1 peut être le résultat d'une sélection clonale des cellules tumorales LMP-1-positives par une réaction immunitaire, car LMP-1 peut être reconnue par les lymphocytes cytotoxiques T, et les patients atteints de CGaEBV conservent normalement la réponse immunitaire des cellules T spécifiques au virus (Lee et al., 2011). Selon Tang et al (2012), les ARNm viraux détectés correspondant à LMP-1 ne sont pas traduits ou la protéine est soit i) exprimée de manière transitoire, ii) rapidement dégradée, iii) localisée dans des cellules rares qui sont rapidement reconnues et détruites par le système immunitaire, ou iv) présente à un niveau si bas que les tests traditionnels sont trop insensibles pour les détecter.

Cependant, des études récentes confirment que l'infection virale latente est associée au phénotype oncogène du carcinome gastrique (Temple et al., 2014) et le model d'expression des gènes de latence (latence I, II ou III) dépend du tissu d'origine et de l'état cellulaire (Murata et al., 2014 ; Sato et al., 2017) les auteurs rajoutent que les cellules tumorales secrètent des facteurs intrinsèques régulant le programme de latence virale tels que les facteurs de transcription. D'après ces études, nous supposons que l'ensemble des altérations

génétiques caractérisant le phénotype oncogène du cancer gastrique dans notre région sont probablement différents par rapport à d'autres régions en raison du polymorphisme génétique, ce qui influence l'absence de l'inhibition de l'expression de LMP-1 observée dans plusieurs études et sa forte expression dans nos échantillons de CG.

Cependant, Truong et ses collaborateurs (2009) arguent au contraire que la détection de LMP-1 dans les CGaEBV résulte d'études inconsistantes ou de réactions croisées dues à des limitations techniques. Les auteurs insistent sur le fait que la détection de la protéine LMP-1 doit s'effectuer dans le contexte d'une analyse parallèle des transcrits viraux par PCR ou ISH.

Afin de répondre aux critiques de ces auteurs et de confirmer les résultats de notre étude histochimique, nous avons donc utilisé une approche de double marquage à IF et FISH.

4.2.2.2 Révélation simultanée d'EBERs et de LMP-1 par double marquage FISH et IF

Cette étude est la première à utiliser une technique de double marquage par FISH et IF pour détecter à la fois les transcrits viraux EBERs et le produit du gène de latence LMP-1 dans des cas d'adénocarcinomes gastriques. Cette technique a été réalisée sur 15 cas, avec un résultat très satisfaisant, puisque pour 5 cas, le double marquage a été positif pour EBERs et LMP-1, et pour 10 cas, le double marquage a été simultanément négatif pour EBERs et LMP-1.

L'expression de LMP-1 est en grand partie identique à celle des EBERs au niveau cellulaire. L'analyse des images nous a permis d'observer une localisation nucléaire des EBERs et cytoplasmique et membranaire de LMP-1.

Selon (Gulley et al., 2002) et (Niedobitek et Herbst., 2001) qui ont élaboré plusieurs protocoles pour la recherche de l'EBV, les tests appliqués pour la détection des EBERs par ISH en combinaison avec la recherche d'un produit de gène de latence simultanément sont des tests plus efficaces que l'un ou l'autre dosage seul pour identifier la malignité associée à l'EBV. Les auteurs ajoutent qu'en raison de la composition hétérogène de nombreuses tumeurs associées à l'EBV, et la présence de prolifération de cellules B non-néoplasiques, l'analyse des expressions génétiques des cellules infectées par l'EBV sur les coupes tissulaires peut également nécessiter des techniques de double marquage afin de déterminer le phénotype des cellules infectées par l'EBV.

En effet, plusieurs études ont utilisé les techniques de double marquage pour la recherche simultanée du génome viral et des marqueurs cellulaires pour le but de déterminer le phénotype des cellules infectées dans différents types de tumeurs associées à l'EBV comme dans

les lymphomes Hodgkiniens (Herndier et al., 1993) et les lymphomes non-Hodgkinien (d'Amore et al., 1996) le NPC (Teramoto et al., 2000) et dans les tissus adénoïdes (Endo et al., 2002).

D'après nos connaissances nous sommes les premiers à avoir testé le double marquage pour EBERs et LMP-1 dans le cas du cancer de l'estomac. Nos résultats nous ont permis de confirmer que cette double coloration simultanée est plus efficace que la détection de l'un ou l'autre marqueur séparément afin d'identifier les CGaEBV.

La détection simultanée des EBERs et de LMP-1 dans les sections de tissu de CG témoigne le rôle étiologique de l'EBV dans la pathogenèse du CG, et confirme que la détection de LMP-1 n'est pas due à une réaction croisée produite lors de l'expérimentation, mais qu'elle est le résultat d'une infection latente du tissu par l'EBV.

4.3 Détection de LMP-1 dans le sérum de patients atteints de cancer gastrique par ELISA

4.3.1 Résultats

Afin d'évaluer la présence de LMP-1 et sa concentration dans le sérum de patients atteints de CG, nous avons utilisé un test ELISA, test adéquat et simple d'utilisation dans le contexte du diagnostic au sein d'un laboratoire d'analyse. Ce test a été réalisé sur 20 échantillons de sérum de patients atteints d'un CG et 20 échantillons de sérum d'individus sains. Nous avons utilisé également un extrait protéique d'une lignée P3HR1 comme témoin positif exprimant LMP-1, et un extrait de sang d'un cordon ombilicale comme témoin négatif n'exprimant pas LMP-1.

Le niveau d'expression de LMP-1 dans les sérums sanguins a été estimé en comparant la densité optique (DO) observée pour chaque échantillon du test ELISA avec celle observée pour le témoin négatif.

Nous avons constaté que 50% des sérums des patients atteints de CG étaient positifs pour l'expression de LMP-1. La DO observée pour chaque individu est largement supérieure à celle observée pour le témoin négatif qui est estimée à $0.184 \pm (0.009)$ (Figure 4.33). Les échantillons considérés LMP-1 positifs ont révélé des DO variant de $0.499 \pm (0.014)$ chez le patient S8 jusqu'à $0.815 \pm (0.014)$ chez l'individu T14. Certains individus présentent des DO supérieures à celle observée pour le témoin négatif sont toutefois considérés négatifs car la différence est faiblement significative. Ainsi, tous les échantillons qui présentent des DO comprises entre $0.187 (\pm 0.004)$ et $0.256 (\pm 0.007)$ sont considérés négatifs pour l'expression

de LMP-1. Ces résultats numériques proviennent de l'analyse statistique de nos données, via l'utilisation du test de conformité d'une moyenne.

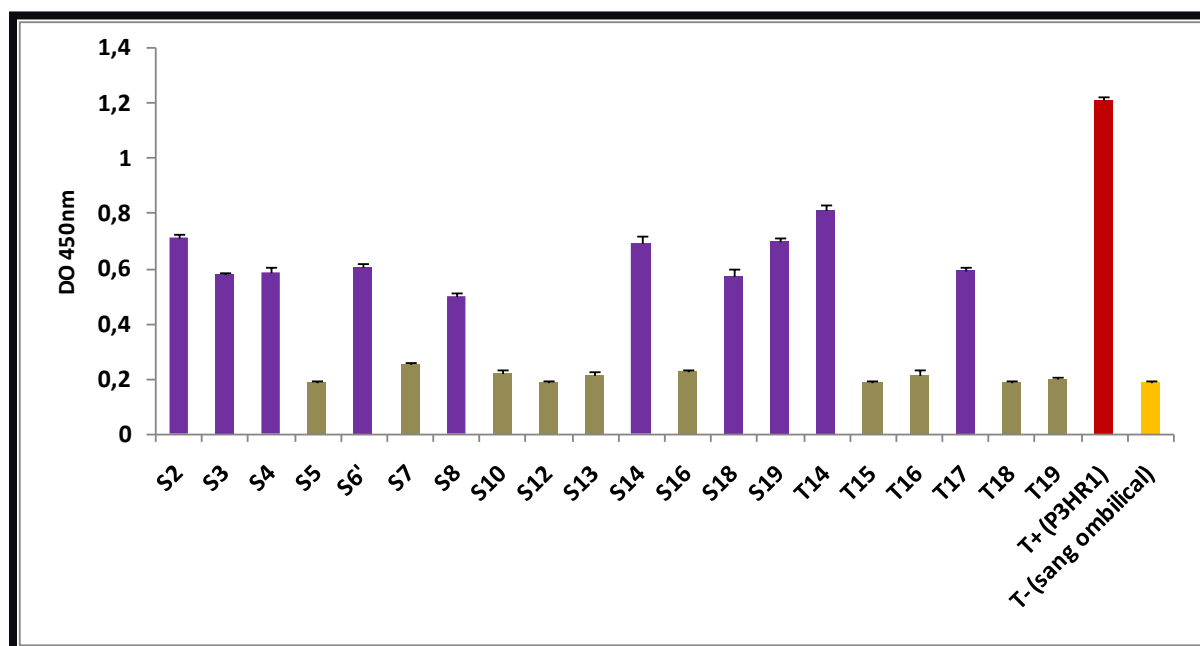


Figure 4.33 : Détection de LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum de patients atteints de CG. Les échantillons présentant une valeur de DO statistiquement différente par rapport à celle observé pour le témoin négatif (sang ombilical) sont mentionnés en couleur violette (S, S3, S4, S6', S8, S14, S18, S19, T14 et T17) ces échantillons sont donc considéré positifs à l'expression de LMP-1.

En parallèle, nous avons effectué une estimation de l'expression de LMP-1 dans les sérums de sujets sains, afin de vérifier que l'expression de LMP-1 était spécifique aux patients atteints de CG. Les résultats obtenus montrent que parmi les 21 échantillons testés, 2 seulement ont présenté des DO supérieures à celles du témoin négatif et les 19 autres échantillons (90.5%) n'expriment clairement pas LMP-1 (Figure 4.34). L'application du test de conformité d'une moyenne révèle que les échantillons d'individus sains sont tous conformes au témoin négatif, ils sont de ce fait négatifs à l'expression de LMP-1.

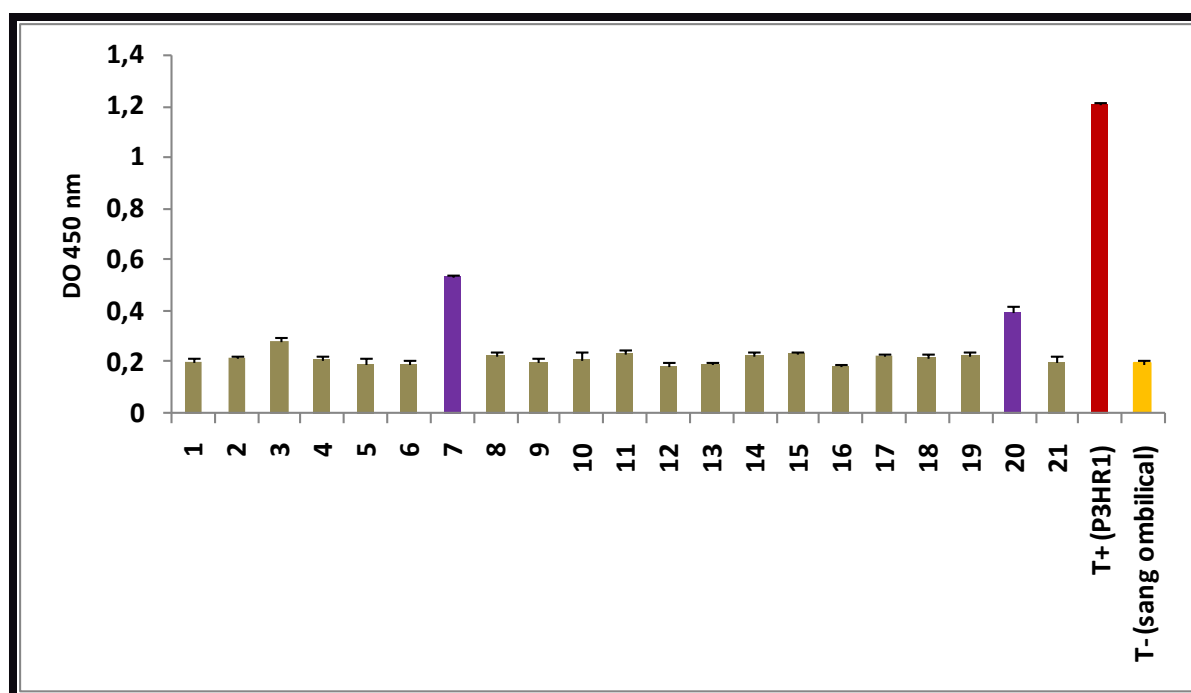


Figure 4.34 : Détection de LMP-1 avec le test ELISA dans le sérum des sujets sains. Seulement les échantillons numéro 7 et 20 ont présenté des DO supérieurs à celle observée pour le témoin négatif.

4.3.2 Discussion

Afin d'une part de confirmer la présence de LMP-1 dans le CG, et d'autre part de rendre cette détection plus simple dans l'optique de l'élaboration d'un diagnostic en laboratoire d'analyses, nous avons décidé d'utiliser la technique ELISA. Cette technique nous a permis de constater la présence de LMP-1 dans 50% (10/20) des échantillons de CG testés, et 90.5% des individus sains sont négatifs. La quantité de LMP-1 chez les sujets malades est donc significativement plus élevée que chez les sujets sains.

Nos résultats suggèrent ainsi des conclusions importantes :

- L'étude du profil sérologique de LMP-1 au sein de populations saines comparativement à des populations atteintes d'un cancer de l'estomac représente un argument de plus en faveur de l'implication de ce virus dans ce type de cancer.
- L'expression de LMP-1 dans le sérum sanguin des malades confirme que cette protéine est bien exprimée dans les CGaEBV, et que son expression n'est pas inhibée comme suggéré par certains auteurs. Sa présence signifie qu'elle joue un rôle important dans la carcinogénèse de cette pathologie.
- De même, la présence de LMP-1 au niveau du sérum prouve que c'est une protéine active pouvant induire de nombreuses voies de signalisation.

Il est intéressant de noter que deux études antérieures ont démontré la présence de LMP-1 et EBNA-1 dans le milieu de culture de deux lignés cellulaires épithéliales gastriques infectées par l'EBV (Takasaka et al., 1998 ; Tajima et al., 1998).

Houali et ses collaborateurs, (2007) ont apporté la sécrétion de LMP-1 dans le sérum et la salive de patients atteints de NPC, ils ont aussi confirmé que l'expression de LMP-1 dans le sérum des souris *nude* peut avoir deux fonctions principales: i) la protection des cellules infectées par l'EBV ii) l'activation du cycle cellulaire par un mécanisme paracrine. Ces deux fonctions sont des étapes importantes dans la carcinogénèse du NPC. Les auteurs rajoutent que ces fonctions sont étroitement liées aux complexes exosomes-LMP-1.

La sécrétion de LMP-1 dans le milieu de culture ou sérums est sous forme de complexe LMP-1-exosomes. Les exosomes ayant des structures membranaires similaires à celles de la membrane cytoplasmique pourraient sortir et rentrer d'une cellule à l'autre par simple fusion membranaire comme déjà rapporté dans les études de Denzer et al. (2000) sur le trafic des exosomes à travers la membrane plasmique. Cette forme de LMP-1 associée aux exosomes est mieux protégée une fois libérée dans la circulation sanguine que la forme libre qui est beaucoup plus vulnérable vis-à-vis surtout de l'attaque par le système immunitaire.

Ainsi, les recherches ont déjà montré que les complexes LMP-1-exosome établis à partir du système Baculovirus peuvent supprimer les fonctions des cellules T primaires. La présence de LMP-1 dans le sérum est donc nécessaire pour l'activité mitogène et suppressive vis-à-vis du système immunitaire.

Ainsi, nous émettons l'hypothèse que la sécrétion de LMP-1 dans le sérum des patients atteints d'un CGaEBV est probablement essentielle au développement du microenvironnement tumoral et à son maintien. Cette oncoprotéine peut avoir un rôle dans l'activation de la multiplication des cellules tumorales et l'échappement du système immunitaire. Dans une future investigation, il serait donc intéressant d'évaluer l'impact de la présence de LMP-1 dans le sérum sur l'activité mitogène des cellules tumorales gastriques, afin de comprendre le mécanisme d'action de cette protéine.

Ce travail est le premier ayant comme but principal la détection de LMP-1 dans le sérum de patients atteints d'un CG. Il sera donc important d'évaluer, dans une prochaine étude, l'expression des EBERS par ISH ou par PCR dans les tissus de ces malades.

La détection de LMP-1 dans le sérum des patients atteints d'un CGaEBV offre de nouvelles perspectives pour le diagnostic de cette maladie. LMP-1 pourrait être un candidat idéal pour l'établissement d'un diagnostic efficace et fiable employant un test de référence ELISA à partir d'un simple prélèvement de sang veineux. Ceci serait une alternative

séduisante à la recherche des transcrit viraux par ISH. En effet, coûts élevés et difficultés de réalisation signifient que l'utilisation de l'ISH est difficile, voire impossible dans un pays aux ressources limitées. De plus, l'ISH est aussi une technique contraignante pour le patient, souvent soumis à des biopsies.

Il est également intéressant de noter que la présence de LMP-1 dans le sérum sanguin pourrait offrir de nouvelles cibles pour l'immunothérapie. Il est cependant clair que d'autres investigations seront nécessaires afin d'élucider totalement le rôle de LMP-1 dans la tumorigénèse des CGaEBV.

CONCLUSION GENERALE

Il y a plus de 50 ans que le virus d'Epstein-Barr, première cause de tumeurs humaines d'origine virale, a été découvert. L'EBV a été par la suite étroitement lié à un large éventail de tumeurs, à la fois lymphoïdes et d'origine épithéliale. Les progrès dans l'analyse moléculaire de l'EBV ont révélé des mécanismes fondamentaux dans la pertinence du processus oncogénique. Ce virus fournit un paradigme pour l'exploitation des connaissances au niveau moléculaire, dans le diagnostic, le traitement, et la prévention du cancer.

Ce travail nous a permis de démontrer pour la première fois la présence de l'EBV dans le CG chez des patients algériens. La détection de marqueurs de transcription virale par FISH a révélé que 22.7% des cancers gastriques sont associés à l'EBV, et 19.7% sont des cas d'adénocarcinomes gastriques ordinaires. Cette fréquence est parmi les fréquences les plus élevées au niveau mondial. Nous supposons que l'endémicité de l'infection à l'EBV en Afrique du Nord peut avoir un effet sur cette haute fréquence. Cependant, d'autres facteurs, tels que les facteurs environnementaux, le mode de vie, ainsi que le phénotype génétique de l'hôte, sont susceptibles d'avoir également un rôle crucial dans ce phénomène. En effet, il a été déterminé qu'une alimentation riche en sel et une grande consommation de tabac sont des facteurs de risque pour les CGaEBV. En Algérie, les aliments traditionnellement conservés tels que la harissa, les fruits et légumes marinés, ou la viande ou la graisse séchée et salée, sont consommés en grande quantité. De plus, le tabagisme est élevé.

Nos résultats montrent que les cas de CGaEBV en Algérie présentent des caractéristiques clinico-pathologiques uniques. En effet, la prédominance des CGaEBV chez des patients âgés de 45 à 60 ans suggère que cette catégorie d'âge est plus exposée à des facteurs professionnels qui peuvent favoriser la survenue et le développement de cette pathologie. D'autre part, la présence de l'EBV principalement dans les cellules tumorales gastriques dans les cancers de type avancé suggère un rôle potentiel de l'EBV dans la progression tumorale.

La présence de caractéristiques clinico-pathologiques uniques des CGaEBV suggère fortement que ce virus n'est pas un simple « spectateur », mais bien un « acteur », susceptible d'influencer le développement et l'entretien de la tumeur par ses caractéristiques biologiques et immunologiques. Les caractéristiques clinico-pathologiques observées dans notre série de cas de CGaEBV ont été identiques à ceux observés dans une autre région du Nord d'Afrique et également différentes de ceux observés dans d'autre région du monde, cela suggère que la

pathologie moléculaire du CGaEBV au Nord d'Afrique est probablement différente de celle dans d'autre région.

De même, nous avons montré une forte expression des EBERs dans les cellules tumorales gastriques, et leur absence dans les cellules normales. Ceci suggère leur importance dans le développement et le maintien de la tumeur. D'autre part, la présence de l'EBV dans les tissus précancéreux prouve que l'infection des cellules épithéliales gastriques est un événement précoce, et précède la rétro différenciation cellulaire. L'infection des cellules dysplasiques gastriques par l'EBV réactivé porté par les lymphocytes pourrait être la première étape du développement des CGaEBV

Dans notre travail, l'étude de LMP-1, marqueur de l'EBV, a révélé une expression active de ce virus dans le tissu gastrique et dans le sérum des patients. Ceci indique non seulement que l'EBV est présent dans des cellules infectées de façon latente, mais soulève aussi la possibilité que cette protéine puisse être associée à une transformation néoplasique des cellules épithéliales gastriques et à l'établissement d'un microenvironnement favorable pour le développement des cellules tumorales infectées par l'EBV.

L'expression de LMP-1 a été significativement liée aux tumeurs de haut grade. Ceci suggère que cette protéine est impliquée dans le maintien du développement tumoral, son rôle *in vivo* reflétant son rôle démontré *in vitro* dans les cellules épithéliales, à savoir la transformation maligne des cellules et la diminution de leur capacité de différenciation.

La faculté de détecter la sécrétion de LMP-1 dans le sérum par la technique ELISA offre la possibilité de développer un outil pour le diagnostic précoce et le pronostic des CGaEBV d'une part simple et fiable, et d'autre part non-contrainquant pour le patient, souvent soumis à des prélèvements de biopsies. LMP-1 pourrait également devenir une cible pour la thérapie ou l'immunothérapie.

Afin de poursuivre ce travail, il serait intéressant dans une future investigation de réaliser une étude portant sur un nombre important de tumeurs gastriques provenant de différentes régions du pays, afin d'évaluer la prévalence réelle des CGaEBV en Algérie. D'autre part, et afin d'expliquer la fréquence élevée des CGaEBV, il serait utile de déterminer la souche de l'EBV à l'origine des CG en Algérie, ainsi que de dépister de possibles altérations génétiques et épigénétiques au sein de la population.

Il serait également utile de préciser les facteurs de risques qui peuvent augmenter la fréquence de la maladie, tels que les facteurs liés aux expositions professionnelles, aux habitudes alimentaires et au mode de vie.

D'autre part, nous pensons que des travaux supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier le profil d'expression de toutes les protéines latentes ou lytiques de l'EBV, ce qui pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes moléculaires par lesquels ce virus contribue à la carcinogenèse du CG.

Il serait également intéressant, dans une future investigation, d'étudier l'activité mitogène de LMP-1 sécrétée dans le sérum de patients, sur une ligné de cellules épithéliales gastriques, afin d'élucider le rôle exact de cette protéine dans le mécanisme de prolifération cellulaire. La présence de LMP-1 dans le sérum ouvre de nouvelles voies thérapeutiques contre le CGaEBV ; il serait intéressant de tester l'effet de l'introduction d'anticorps anti LMP-1 chez des souris *nude*, dans lesquelles des tumeurs ont été induites. Ceci pourrait potentiellement constituer une étape importante vers une nouvelle thérapie.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abdirad, A., Ghaderi-Sohi, S., Shuyama, K., Koriyama, C., Nadimi-Barforoosh, H., Emami, S., Mosavi-Jarrahi, A., Nahvijou, A., and Akiba, S. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: a report from Iran in the last four decades. *Diagn Pathol* (2007), 15; 2:25.
- Abe, H., Kaneda, A., and Fukayama, M. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma: Use of Host Cell Machineries and Somatic Gene Mutations. *Pathobiology* (2015), 82(5):212-23.
- Abe, H., Maeda, D., Hino, R., Otake, Y., Isogai, M., Ushiku, AS., Matsusaka, K., Kunita, A., Ushiku, T., Uozaki, H., Tateishi, Y., Hishima, T., Iwasaki, Y., Ishikawa, S., and Fukayama, M. ARID1A expression loss in gastric cancer: pathway-dependent roles with and without Epstein-Barr virus infection and microsatellite instability. *Virchows Arch* (2012), 461(4):367-77.
- Adams, A., and Lindahl, T. Epstein-Barr virus genomes with properties of circular DNA molecules in carrier cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (1975), 72(4): 1477-81.
- Aga, M., Bentz, GL., Raffa, S., Torrisi, MR., Kondo, S., Wakisaka, N., Yoshizaki, T., Pagano, JS., and Shackelford, J. Exosomal HIF1 α supports invasive potential of nasopharyngeal carcinoma-associated LMP1-positive exosomes. *Oncogene* (2014), 11; 33(37):4613-22.
- Ahmed, W., and Khan, G. The labyrinth of interactions of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *Rev Med Virol* (2014), 24(1):3-14.
- Ahmed, W., Philip, PS., Tariq, S., and Khan, G. Epstein-Barr virus-encoded small RNAs (EBERs) are present in fractions related to exosomes released by EBV-transformed cells. *PLoS One* (2014), 4; 9(6):e99163.
- Akiba, S., Koriyama, C., Herrera-Goepfert, R., and Eizuru, Y. Epstein-Barr virus associated gastric carcinoma: epidemiological and clinicopathological features. *Cancer Sci* (2008), 99(2):195-201.
- Alfieri, C., Birkenbach, M., and Kieff, E. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* (1991), 181:595-608.
- Ali, AS., Al-Shraim, M., Al-Hakami, AM., and Jones, IM. Epstein- Barr Virus: Clinical and Epidemiological Revisits and Genetic Basis of Oncogenesis. *Open Virol J* (2015), 3; 9:7-28.
- Alipov, G., Nakayama, T., Nakashima, M., Wen, CY., Niino, D., Kondo, H., Pruglo, Y., and Sekine, I. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Kazakhstan. *World J Gastroenterol* (2005), 7; 11(1):27-30.
- Allday, MJ., Bazot, Q., and White, RE. The EBNA3 Family: Two Oncoproteins and a Tumour Suppressor that Are Central to the Biology of EBV in B Cells. *Curr Top Microbiol Immunol* (2015), 391:61-117.
- Al-Mozaini, M., Bodelon, G., Karstegl, CE., Jin, B., Al-Ahdal, M., and Farrell, PJ. Epstein-Barr virus BART gene expression. *J Gen Virol* (2009), 90(Pt 2):307-16.

- Anderton, E., Yee, J., Smith, P., Crook, T., White, RE., and Allday, MJ. Two Epstein-Barr virus (EBV) oncoproteins cooperate to repress expression of the proapoptotic tumour-suppressor Bim: clues to the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Oncogene* (2008), 17; 27(4):421-33.
- Ando, M., Sato, Y., Takata, K., Nomoto, J., Nakamura, S., Ohshima, K., Takeuchi, T., Orita, Y., Kobayashi, Y., and Yoshino, T. A20 (TNFAIP3) deletion in Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders/lymphomas. *PLoS One* (2013), 8(2):e56741.
- Apcher, S., Daskalogianni, C., Manoury, B., and Fahraeus, R. Epstein Barr virus-encoded EBNA1 interference with MHC class I antigen presentation reveals a close correlation between mRNA translation initiation and antigen presentation. *PLoS Pathog* (2010), 6(10):e1001151.
- Arbach, H., Viglasky, V., Lefeu, F., Guinebretière, JM., Ramirez, V., Bride, N., Boualaga, N., Bauchet, T., Peyrat, JP., Mathieu, MC., Mourah, S., Podgorniak, MP., Seignerin, JM., Takada, K., and Joab, I. Epstein-Barr virus (EBV) genome and expression in breast cancer tissue: effect of EBV infection of breast cancer cells on resistance topaclitaxel (Taxol). *J Virol* (2006), 80(2):845-53.
- Arikawa, J., Tokunaga, M., Satoh, E., Tanaka, S., and Land, CE. Morphological characteristics of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma: a case-control study. *Pathol Int* (1997), 47(6):360-7.
- Arita, S., Kinoshita, Y., Ushida, K., Enomoto, A., and Inagaki-Ohara, K. High-fat diet feeding promotes stemness and precancerous changes in murine gastric mucosa mediated by leptin receptor signaling pathway. *Arch Biochem Biophys* (2016), 15; 610: 16-24.
- Arrand, JR., and Rymo, L. Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* (1982), 41(2):376-89.
- Arvin, A., Campadelli-Fiume, G., Mocarski, E., alLongnecker, R., and Neipel, F. Introduction to the human γ -herpesviruses. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al. eds. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge, Cambridge University Press, (2007); pp. 341–359.
- Asaka, M., Takeda, H., Sugiyama, T., and Kato, M. What role does Helicobacter pylori play in gastric cancer? *Gastroenterology* (1997), 113(6 Suppl):S56-60.
- Asombang, AW., Rahman, R., and Ibdah, JA. Gastric cancer in Africa: current management and outcomes. *World J Gastroenterol* (2014), 14; 20 (14):3875-9.

B

- Babcock, GJ., Decker, LL., Freeman, RB., and Thorley-Lawson, DA. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* (1999), 190 (4):567-576.
- Babcock, GJ., Hochberg, D., and Thorley-Lawson, AD. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* (2000), 13:497–506.
- Bae, JM., and Kim, EH. Epstein - Barr virus and Gastric Cancer Risk: A Meta-analysis With Meta-regression of Case-control Studies. *J Prev Med Public Health* (2016), 49 (2):97-107.

- Baer, R., Bankier, AT., Biggin, MD., Deininger, PL., Farrell, PJ., Gibson, TJ., Hatfull, G., Hudson, GS., Satchwell, SC., Séguin, C., et al . DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein–Barr virus genome. *Nature* (1984), 19-25;310(5974):207-11.
- Bagnardi, V., Rota, M., Botteri, E., Tramacere, I., Islami, F., Fedirko, V., Scotti, L., Jenab, M., Turati, F., Pasquali, E., Pelucchi, C., Galeone, C., Bellocco, R., Negri, E., Corrao, G., Boffetta, P., and La Vecchia, C. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. *Br J Cancer* (2015), 3; 112(3):580-93.
- Bajaj, BG., Murakami, M., Cai, Q., Verma, SC., Lan, K., and Robertson, ES. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with and enhances the stability of the c-Myc oncoprotein. *J Virol* (2008), 82(8):4082-90.
- Balachandran, N., Pittari, J., and Hutt-Fletcher, LM. Detection by monoclonal antibodies of an early membrane protein induced by Epstein-Barr virus. *J Virol* (1986), 60(2):369-75.
- Bánáti, F., Koroknai, A., and Szenthe, K. Terminal Repeat Analysis of EBV Genomes. *Methods Mol Biol* (2017), 1532: 169-177.
- Banerjee, AS., Pal, AD., and Banerjee, S. Epstein-Barr virus-encoded small non-coding RNAs induce cancer cell chemoresistance and migration. *Virology* (2013), 443: 294–305.
- Bartel, DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* (2004), 23; 116(2):281-97.
- Barth, S., Meister, G., and Grässer, FA. EBV-encoded miRNAs. *Biochim Biophys Acta*. (2011), 1809(11-12):631-40.
- Bass, AJ., Thorsson, V., Shmulevich, I., Reynolds, SM., Miller, M., Bernard, B., Hinoue, T., Laird, PW., Curtis, C., and Shen, H. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* (2014), 513:202-209.
- Bayliss, GJ., and Wolf, H. Epstein--Barr virus-induced cell fusion. *Nature* (1980), 11; 287 (5778):164-5.
- Behjati, S., and Tarpey, PS. What is next generation sequencing? *Arch Dis Child Educ Pract Ed* (2013), 98(6):236-8.
- Ben-Sasson, SA., and Klein, G. Activation of the Epstein-Barr virus genome by 5-azacytidine in latently infected human lymphoid lines. *Int J Cancer* (1981), 15; 28(2):131-5.
- Berlth, F., Bollschweiler, E., Drebber, U., Hoelscher, AH., and Moenig, S. Pathohistological classification systems in gastric cancer: diagnostic relevance and prognostic value. *World J Gastroenterol* (2014), 21; 20(19):5679-84.
- Bertuccio, P., Chatenoud, L., Levi, F., Praud, D., Ferlay, J., Negri, E., Malvezzi, M., and La Vecchia, C. Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* (2009), 1; 125(3):666-73.
- Bhattacharjee, S., Ghosh Roy, S., Bose, P., and Saha, A. Role of EBNA-3 Family Proteins in EBV Associated B-cell Lymphomagenesis. *Front Microbiol* (2016), 7; 7:457.
- Birkenbach, M., Tong, X., Bradbury, LE., Tedder, TF., and Kieff, E. Characterization of an Epstein-Barr virus receptor on human epithelial cells. *J Exp Med* (1992), 1; 176(5):1405-14.
- Boeing, H., and Frentzel-Beyme, R. Regional risk factors for stomach cancer in the FRG. *Environ Health Perspect* (1991), 94:83-9.
- Borza, CM., and Hutt-Fletcher, LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat Med* (2002), 8: 594–599.

- Boysen, T., Mohammadi, M., Melbye, M., Hamilton-Dutoit, S., Vainer, B., Hansen, AV., Wohlfahrt, J., and Friborg, J. EBV-associated gastric carcinoma in high- and low-incidence areas for nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* (2009), 4; 101(3):530-3.
- Boysen, T., Friborg, J., Stribolt, K., Hamilton-Dutoit, S., Goertz, S., Wohlfahrt, J., and Melbye, M. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma among patients with pernicious anemia. *Int J Cancer*. (2011) 1;129(11):2756-60
- Bultema, R., Longnecker, R., and Swanson-Mungerson, M. Epstein-Barr virus LMP2A accelerates MYC-induced lymphomagenesis. *Oncogene* (2009), 19; 28(11):1471-6.
- Burke, AP., Yen, TS., Shekitka, KM., and Sobin, LH. Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein-Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* (1990), 3(3): 377-80.
- Burkitt, D. A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature* (1962), 194: 232–234.
- Burkitt, D. A sarcoma involving the jaws in African children. *Br J Surg* (1958), 46(197):218-23.
- Bykova, VP., Khafizova, FA., Kalinina, DV., and Daïkhes, NA. Chromogenic in situ hybridization in diagnostics of Epstein-Barr-virus infection in chronic tonsillitis. *Arkhh Patol* (2012), 74(2):19-2.

C

- Calderwood, MA., Venkatesan, K., Xing, L., Chase, MR., Vazquez, A., Holthaus, AM., Ewence, AE., Li, N., Hirozane-Kishikawa, T., Hill, DE., Vidal, M., Kieff, E., and Johannsen, E. Epstein-Barr virus and virus human protein interaction maps. *Proc Natl Acad Sci USA* (2007), 1; 104(18):7606–11.
- Camargo, MC., Koriyama, C., Matsuo, K., Kim, WH., Herrera-Goepfert, R., Liao, LM., Eurgast-EPIC, Group., Yu, J., Carrasquilla, G., Sung, JJ., Alvarado-Cabrero, I., Lissowska, J., Meneses-Gonzalez, F., Yatabe, Y., Ding, T., Hu, N., Taylor, PR., Morgan, DR., Gulley, ML., Torres, J., Akiba, S., and Rabkin, CS. Case-case comparison of smoking and alcohol risk associations with Epstein-Barr virus-positive gastric cancer. *Int J Cancer* (2014), 15; 134(4):948-53.
- Camargo, MC., Murphy, G., Koriyama, C., Pfeiffer, RM., Kim, WH., Herrera-Goepfert, R., Corvalan, AH., Carrascal, E., Abdirad, A., Anwar, M., Hao, Z., Kattoor, J., Yoshiwara-Wakabayashi, E., Eizuru, Y., Rabkin, CS., and Akiba, S. Determinants of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: an international pooled analysis. *Br J Cancer* (2011), 28; 105(1):38-43.
- Campos, FI., Koriyama, C., Akiba, S., Carrasquilla, G., Serra, M., Carrascal, E., Itoh, T., Minakami, Y., and Eizuru, Y. Environmental factors related to gastric cancer associated with Epstein-Barr virus in Colombia. *Asian Pac J Cancer Prev* (2006), 7(4):633-7.
- Canaan, A., Haviv, I., Urban, AE., Schulz, VP., Hartman, S., Zhang, Z., Palejev, D., Deisseroth, AB., Lacy, J., Snyder, M., Gerstein, M., and Weissman, SM. EBNA1 regulates cellular gene expression by binding cellular promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009), 106:22421–22426.
- Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* (2014), 11; 513(7517):202-9.

- Cao, JY., Mansouri, S., and Frappier, L. Changes in the nasopharyngeal carcinoma nuclear proteome induced by the EBNA1 protein of Epstein–Barr virus reveal potential roles for EBNA1 in metastasis and oxidative stress responses. *J Virol* (2012), 86:382–394.
- Cao, M., Wang, Q., Lingel, A., and Zhang, L. Nuclear factor κ B represses the expression of latent membrane protein 1 in Epstein-Barr virus transformed cells. *World J Virol* (2014), 12; 3(4):22-9.
- Cárdenas-Mondragón, MG., Torres, J., Flores-Luna, L., Camorlinga-Ponce, M., Carreón-Talavera, R., Gomez-Delgado, A., Kasamatsu, E., and Fuentes-Pananá, EM. Case–control study of Epstein–Barr virus and *Helicobacter pylori* serology in Latin American patients with gastric disease. *Br J Cancer* (2015), 9; 112(12):1866-73.
- Carneiro, F., Wen, X., Seruca, R., and Oliveira, C. Familial gastric carcinoma. *Diagn Histopathol* (2014), 20:239–246.
- Cen, O., and Longnecker, R. Latent Membrane Protein 2 (LMP2). *Curr Top Microbiol Immunol* (2015), 391:151-80.
- Chan, JY., Gao, W., Ho, WK., Wei, WI., and Wong, TS. Overexpression of Epstein-Barr virus-encoded microRNA-BART7 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* (2012), 32(8):3201-10.
- Chan, WY., Liu, Y., Li, CY., Ng, EK., Chow, JH., Li, KK., and Chung, SC. Recurrent genomic aberrations in gastric carcinomas associated with *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus. *Diagn Mol Pathol* (2002), 11(3):127-34.
- Chang, KC., Chen, PC., Chang, Y., Wu, YH., Chen, YP., Lai, CH., Jeffrey Medeiros, L., Su, IJ., and Wang, HW. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 up-regulates cytokines and correlates with older age and poorer prognosis in Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. (2017);70(3):442-455
- Chang, KC., Chen, PC., Chang, Y., Wu, YH., Chen, YP., Lai, CH., Jeffrey Medeiros, L., Su, IJ., and Wang, HW. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 up-regulates cytokines and correlates with older age and poorer prognosis in Hodgkin lymphoma. *Histopathology*. (2017);70(3):442-455
- Chang, MS ., Lee, JH., Kim, JP., Kim, HS., Lee, HS., Kim, CW., Kim, YI., and Kim, WH. Microsatellite instability and Epstein-Barr virus infection in gastric remnant cancers. *Pathol Int* (2000), 50(6): 486–92.
- Chang, Y., Tung, CH., Huang, YT., Lu, J., Chen, JY., and Tsai, CH. Requirement for cell-to-cell contact in Epstein-Barr virus infection of nasopharyngeal carcinoma cells and keratinocytes. *J Virol* (1999), 73(10):8857-66.
- Chapel, F., Fabiani, B., Davi, F., Raphael, M., Tepper, M., Champault, G., and Guettier, C. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma in Western patients: comparison of pathological parameters and p53 expression in EBV-positive and negative tumours. *Histopathology* (2000), 36, 252-61.
- Chen, C., Li, D., and Guo, N. Regulation of cellular and viral protein expression by the Epstein-Barr virus transcriptional regulator Zta: implications for therapy of EBV associated tumors. *Cancer Biol Ther* (2009), 8(11):987-95.
- Chen, HL., Peng, J., Zhu, XB., Gao, J., Xue, JL., Wang, MW., and Xia, HS. Detection of EBV in nasopharyngeal carcinoma by quantum dot fluorescent in situ hybridization. *Exp Mol Pathol* (2010), 89(3): 367-71.

- Chen, J. Roles of the PI3K/Akt pathway in Epstein-Barr virus-induced cancers and therapeutic implications. *World J Virol* (2012), 12; 1(6):154-61.
- Chen, JN., He, D., Tang, F., and Shao, CK. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a newly defined entity. *J Clin Gastroenterol* (2012), 46(4):262–71.
- Chen, R., Zhang, M., Li, Q., Xiong, H., Liu, S., Fang, W., Zhang, Q., Liu, Z., Xu, X., and Jiang, Q. The Epstein-Barr Virus-encoded miR-BART22 targets MAP3K5 to promote host cell proliferative and invasive abilities in nasopharyngeal carcinoma. *J Cancer* (2017), 25; 8(2):305-313.
- Chen, SY., Zhang, RG., and Duan, GC. Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review). *Oncol Rep* (2016)(a), 36(6):3087-3094.
- Chen, BJ., Chang, ST., Weng, SF., Huang, WT., Chu, PY., Hsieh, PP., Jung, YC., Kuo, CC., Chuang, YT., and Chuang, SS. EBV-associated Burkitt lymphoma in Taiwan is not age-related. *Leuk Lymphoma*. (2016)(b);57(3):644-53
- Chen, XZ., Chen, H., Castro, FA., Hu, JK., and Brenner, H. Epstein-Barr virus infection and gastric cancer: a systematic review. *Medicine* (Baltimore). (2015); 94(20):e792.
- Cheng, TC., Hsieh, SS., Hsu, WL., Chen, YF., Ho, HH., and Sheu, LF. Expression of Epstein-Barr nuclear antigen 1 in gastric carcinoma cells is associated with enhanced tumorigenicity and reduced cisplatin sensitivity. *Int J Oncol* (2010), 36:151–60.
- Cheng, XJ., Lin, JC., and Tu, SP. Etiology and Prevention of Gastric Cancer. *Gastrointest Tumors* (2016), 3(1):25-36.
- Chesnokova, LS., and Hutt-Fletcher, LM. Epstein-Barr virus infection mechanisms. *Chin J Cancer* (2014), 33(11):545-8.
- Cho, J., Kang, MS., and Kim, KM. Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Specific Features of the Accompanying Immune Response. *J Gastric Cancer* (2016), 16(1):1-7.
- Choi, MG., Jeong, JY., Kim, KM., Bae, JM., Noh, JH., Sohn, TS., and Kim, S. Clinical significance of gastritis cystica profunda and its association with Epstein-Barr virus in gastric cancer. *Cancer* (2012), 1; 118(21):5227-33.
- Chong, JM., Fukayama, M., Hayashi, Y., Funata, N., Takizawa, T., Koike, M., Muraoka, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Miyaki, M., and Mizuno, S. Expression of CD44 variants in gastric carcinoma with or without Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* (1997), 22; 74(4):450-4.
- Choy, EY., Siu, KL., Kok, KH., Lung, RW., Tsang, CM., To, KF., Kwong, DL., Tsao, SW., and Jin, DY. An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* (2008), 27; 205(11):2551-60.
- Chung, GT., Lou, WP., Chow, C., To, KF., Choy, KW., Leung, AW., Tong, CY., Yuen, JW., Ko, CW., Yip, TT., Busson, P., and Lo, KW. Constitutive activation of distinct NF- κ B signals in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *J Pathol* (2013), 231(3):311-22.
- Chuang, SS., Ye, H., Du, MQ., Lu, CL., Dogan, A., Hsieh, PP., Huang, WT., and Jung, YC. Histopathology and immunohistochemistry in distinguishing Burkitt lymphoma from diffuse large B-cell lymphoma with very high proliferation index and with or without a starry-sky pattern: a comparative study with EBER and FISH. *Am J Clin Pathol*. (2007);128(4):558-64

- Clarke, PA., Schwemmle, M., Schickinger, J., Hilse, K., and Clemens, MJ. Binding of Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 to the double-stranded RNA-activated protein kinase DAI. *Nucleic Acids Res* (1991), 25;19(2):243-8.
- Coelho, E., Magalhães, A., Dinis-Ribeiro, M., and Reis, CA. Molecular Mechanisms for Adhesion and Colonization of Human Gastric Mucosa by *Helicobacter pylori* and its Clinical Implications]. *Acta Med Port* (2016), 29(7-8):476-483.
- Coffin, WF 3rd., Erickson, KD., Hoedt-Miller, M., and Martin, JM. The cytoplasmic amino-terminus of the Latent Membrane Protein-1 of Epstein-Barr Virus: relationship between transmembrane orientation and effector functions of the carboxy-terminus and transmembrane domain. *Oncogene* (2001), 30; 20(38):5313-30.
- Cohen, AJ., and Roe, FJ. Evaluation of the etiological role of dietary salt exposure in gastric and other cancers in humans. *Food Chem Toxicol* (1997), 35(2):271-93.
- Cohen, JL., and Lekstrom, K. Epstein-Barr virus BARF1 protein is dispensable for B-cell transformation and inhibits alpha interferon secretion from mononuclear cells. *J Virol* (1999), 73(9):7627-32.
- Cohen, JL., Wang, F., Mannick, J., and Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 is a key determinant of lymphocyte transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1989), 86:9558–9562.
- Cohon . Virology and Molecular Biology of Epstein-Barr Virus. 2006 in A. Teslis et H. B. Jensen. 2006. Epstein Barr Virus. Edition. Taylor and Francis.
- Colvin, H., Yamamoto, K., Wada, N., and Mori, M. Hereditary Gastric Cancer Syndromes. *Surg Oncol Clin N Am* (2015), 24(4):765-77.
- Campos, FI, Koriyama, C, Akiba, S, Carrasquilla, G, Serra, M, Carrascal, E., and Itoh, T, Minakami Y, Eizuru Y. Environmental factors related to gastric cancer associated with Epstein-Barr virus in Colombia. *Asian Pac J Cancer Prev.* (2006);7(4):633-7.
- Correa, P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* (1988), 1; 48(13):3554-60.
- Correa, P., Haenszel, W., Cuello, C., Tannenbaum, S., and Archer, M. A model for gastric cancer epidemiology. *Lancet* (1975), 12; 2(7924):58-60.
- Corvalan, A., Koriyama, C., Akiba, S., Eizuru, Y., Backhouse, C., Palma, M., Argandoña, J., and Tokunaga, M. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with a diffuse histology: a study in one area of Chile. *Int J Cancer* (2001), 94; 527-30.

D

- Dai, C., Geng, R., Wang, C., Wong, A., Qing, M., Hu, J., Sun, Y., Lo, AW., and Li, J. Concordance of immune checkpoints within tumor immune contexture and their prognostic significance in gastric cancer. *Mol Oncol* (2016), 10(10):1551-1558.
- Dantuma, NP ., Sharipo, A., and Masucci, MG. Avoiding proteasomal processing: the case of EBNA1. *Curr Top Microbiol Immunol* (2002), 269:23–36.
- Danve, C., Decaussin, G., Busson, P., and Ooka, T. Growth transformation of primary epithelial cells with a NPC-derived Epstein-Barr virus strain. *Virology* (2001), 288: 223-35.

- Dardari, R., Khyatti, M., Cordeiro, P., Odda, M., ElGueddari, B., Hassar, M., and Menezes, J. High frequency of latent membrane protein-1 30-bp deletion variant with specific single mutations in Epstein-Barr virus-associated nasopharyngeal carcinoma in Moroccan patients. *Int J Cancer* (2006), 15; 118(8):1977-83.
- Davison, AJ. Comparative analysis of the genomes. In: Arvin A, Campadelli-Fiume G, Mocarski E, et al., editors. Human Herpesviruses: Biology, Therapy, and Immunoprophylaxis. Cambridge: *Cambridge University Press* (2007), Chapter 2
- Dawson, CW, Laverick, L, Morris, MA, Tramoutanis, G, and Young, LS. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J Virol* (2008); 82: 3654–3664
- Dawson, CW., Port, RJ., and Young, LS. The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Semin Cancer Biol* (2012), 22(2):144-53.
- Dawson, CW., Rickinson, AB., and Young, LS. Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial differentiation. *Nature* (1990), 344:777-780.
- Day, L., Chau, CM., Nebozhyn, M., Rennekamp, AJ., Showe, M., and Lieberman, PM. Chromatin profiling of Epstein-Barr virus latency control region. *J Virol* (2007), 81(12):6389-401.
- da Costa, VG., Marques-Silva, AC., and Moreli, ML. The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP1) 30-bp deletion and XhoI-polymorphism in nasopharyngeal carcinoma: a meta-analysis of observational studies. *Syst Rev.* (2015) 13;4:46.
- d'Amore, F, Johansen, P, Houmand, A, Weisenburger, DD., and Mortensen, LS. Epstein-Barr virus genome in non-Hodgkin's lymphomas occurring in immunocompetent patients: highest prevalence in nonlymphoblastic T-cell lymphoma and correlation with a poor prognosis. Danish Lymphoma Study Group, LYFO. *Blood.* (1996) 1;87(3):1045-55.
- de Martel, C., Ferlay, J., Franceschi, S., Vignat, J., Bray, F., Forman, D., and Plummer, M. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* (2012), 13(6):607-15.
- de Oliveira, JG., Rossi, AF., Nizato, DM., Cadamuro, AC., Jorge, YC., Valsechi, MC., Venâncio, LP., Rahal, P., Pavarino, ÉC., Goloni-Bertollo, EM., and Silva, AE. Influence of functional polymorphisms in TNF- α , IL-8, and IL-10 cytokine genes on mRNA expression levels and risk of gastric cancer. *Tumour Biol* (2015), 36(12):9159-70.
- de Souza, CR., de Oliveira, KS., Ferraz, JJ., Leal, MF., Calcagno, DQ., Seabra, AD., Khayat, AS., Montenegro, RC., Alves, AP., Assumpção, PP., Smith, MC., and Burbano, RR. Occurrence of *Helicobacter pylori* and Epstein-Barr virus infection in endoscopic and gastric cancer patients from Northern Brazil. *BMC Gastroenterol* (2014), 15;14:179
- de Vries, AC., and Kuipers, EJ. Epidemiology of premalignant gastric lesions: implications for the development of screening and surveillance strategies. *Helicobacter* (2007), 12 Suppl 2:22-31.
- Denzer, K., Kleijmeer, M.J., Heijnen, H.F., Stoorvogel, W. and Geuze H.J. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci.* (2000). 113: 3365-74.

- Derks, S., Liao, X., Chiaravalli, AM., Xu, X., Camargo, MC., Solcia, E., Sessa, F., Fleitas, T., Freeman, GJ., Rodig, SJ., Rabkin, CS., and Bass, AJ. Abundant PD-L1 expression in Epstein-Barr Virus-infected gastric cancers. *Oncotarget* (2016), 31; 7(22):32925-32.
- Di Palma, S., Collins, N., Faulkes, C., Ping, B., Ferns, G., Haagsma, B., Layer, G., Kissin, M., and Cook, MG . Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* (2007), 60 (9):1067-8.
- Dickerson, SJ., Xing, Y., Robinson, AR., Seaman, WT., Gruffat, H., and Kenney, SC. Methylation-dependent binding of the epstein-barr virus BZLF1 protein to viral promoters. *PLoS Pathog* (2009), 5(3) : e1000356.
- Dölken, L., Malterer, G., Erhard, F., Kothe, S., Friedel, CC., Suffert, G., Marcinowski, L., Motsch, N., Barth, S., Beitzinger, M., Lieber, D., Bailer, SM., Hoffmann, R., Ruzsics, Z., Kremmer, E., Pfeffer, S., Zimmer, R., Koszinowski, UH., Grässer, F., Meister, G., and Haas, J. Systematic analysis of viral and cellular microRNA targets in cells latently infected with human gamma-herpesviruses by RISC immunoprecipitation assay. *Cell Host Microbe* (2010), 22; 7(4):324-34.
- Dong, M., Wang, HY., Zhao, XX., Chen, JN., Zhang, YW., Huang, Y., Xue, L., Li, HG., Du, H., Wu, XY., and Shao, CK. Expression and prognostic roles of PIK3CA, JAK2, PD-L1, and PD-L2 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Hum Pathol* (2016), 53:25-34.
- Dresang, LR., Vereide, DT., and Sugden, B. Identifying sites bound by Epstein–Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) in the human genome: defining a position-weighted matrix to predict sites bound by EBNA1 in viral genomes. *J Virol* (2009), 83:2930–2940.
- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G., and Bornkamm, GW. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *JVirol.* (2003);77(15):8290-8
- Dudziak, D., Kieser, A., Dirmeier, U., Nimmerjahn, F., Berchtold, S., Steinkasserer, A., Marschall, G., Hammerschmidt, W., Laux, G., and Bornkamm, GW. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus induces CD83 by the NF-kappaB signaling pathway. *JVirol.* (2003);77(15):8290-8
- Duell, EJ., Travier, N., Lujan-Barroso, L., Clavel-Chapelon, F., Boutron-Ruault, MC., Morois, S., Palli, D., Krogh, V., Panico, S., Tumino, R., Sacerdote, C., Quirós, JR., Sánchez-Cantalejo, E., Navarro, C., Gurrea, AB., Dorronsoro, M., Khaw, KT., Allen, NE., Key, TJ., Bueno-de-Mesquita, HB., Ros, MM., Numans, ME., Peeters, PH., Trichopoulou, A., Naska, A., Dilis, V., Teucher, B., Kaaks, R., Boeing, H., Schütze, M., Regner, S., Lindkvist, B., Johansson, I., Hallmans, G., Overvad, K., Egeberg, R., Tjønneland, A., Lund, E., Weiderpass, E., Braaten, T., Romieu, I., Ferrari, P., Jenab, M., Stenling, R., Aune, D., Norat, T., Riboli, E., and González, CA. Alcohol consumption and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. *Am J Clin Nutr* (2011), 94(5):1266-75.
- Dukers, DF., Meij, P., Vervoort, MB., Vos, W., Scheper, RJ., Meijer, CJ., Bloemena, E., and Middeldorp, JM. Direct immunosuppressive effects of EBV-encoded latent membrane protein 1. *J Immunol* (2000), 15; 165(2):663-70.

Dutton, A., Woodman, CB., Chukwuma, MB., Last, JL., Wei, W., Vockerodt, M., Baumforth, KR., Flavell, JR., Rowe, M., Taylor, AM., Young, LS., and Murray, PG. Bmi-1 is induced by the Epstein-Barr virus oncogene LMP1 and regulates the expression of viral target genes in Hodgkin lymphoma cells. *Blood* (2007), 15; 109(6):2597-603.

E

Elegheert, J., Bracke, N., Pouliot, P., Gutsche, I., Shkumatov, AV., Tarbouriech, N., Verstraete, K., Bekaert, A., Burmeister, WP., Svergun, DI., Lambrecht, BN., Vergauwen, B., and Savvides, SN. Allosteric competitive inactivation of hematopoietic CSF-1 signaling by the viral decoy receptor BARF1. *Nat Struct Mol Biol* (2012), 19(9):938-47.

Elgueta, R., de Vries, VC., and Noelle, RJ. The immortality of humoral immunity. *Immunol Rev* (2010), 236:139-50.

Eliopoulos, AG., and Rickinson, AB. Epstein-Barr virus : LMP1 masquerades as an active receptor. *Curr Biol* (1998), 8: R196-8.

Eliopoulos, AG., and Young, LS. LMP1 structure and signal transduction. *Semin Cancer Biol* (2001), 11: 435-44.

Endo, LH, Vassallo, J, Sakano, E, and Brousset, P. Detection of Epstein-Barr virus and subsets of lymphoid cells in adenoid tissue of children under 2 years of age. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* (2002) 2;66(3):223-6

Epstein, MA., Achong, BG., and Barr, YM. Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet* (1964), 283: 702–703.

Epstein, MA., Hunt, RD., and Rabin, H. Pilot experiments with EB virus in owl monkeys (*Aotus trivirgatus*). I Reticuloproliferative disease in an inoculated animal. *Int J Cancer* (1973), 15; 12(2):309-18.

Ersing, I., Bernhardt, K., and Gewurz, BE. NF- κ B and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1. *Viruses* (2013), 21; 5(6):1587-606.

Essmann, F., and Schulze-Osthoff, K. Translational approaches targeting the p53 pathway for anti-cancer therapy. *Br J Pharmacol* (2012), 165(2):328-44.

F

Fahmi, H., Cochet, C., Hmama, Z., Opolon, P., and Joab, I. Transforming growth factor beta 1 stimulates expression of the Epstein-Barr virus BZLF1 immediate-early gene product ZEBRA by an indirect mechanism which requires the MAPK kinase pathway. *J Virol* (2000), 74(13):5810-8.

Fahraeus, R., Chen, W., Trivedi, P., Klein, G., and Obrink, B. Decreased expression of E-cadherin and increased invasive capacity in EBV-LMP-transected human epithelial and murine adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* (1992), 52:834-83.

Fang, X., Wei, J., He, X., An, P., Wang, H., Jiang, L., Shao, D., Liang, H., Li, Y., Wang, F., and Min, J. Landscape of dietary factors associated with risk of gastric cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies. *Eur J Cancer* (2015), 51(18):2820-32.

Farell, PJ. Epstein Barr virus. Strain variation in Epstein Barr virus. One Herpes virus. Many diseases. Munz C. *Edition Springer Volume 1*(2015) pp: 45-71.

Farrell, PJ. Tumour viruses--could they be an Achilles' heel of cancer? *Eur J Cancer* (2002), 38(14): 1815-1816.

- Feederle, R., Kost, M., Baumann, M., Janz, A., Drouet, E., Hammerschmidt, W., and Delecluse, HJ. The Epstein-Barr virus lytic program is controlled by the co-operative functions of two transactivators. *EMBO J* (2000), 15; 19(12):3080-9.
- Feng, BJ., Jalbout, M., Ayoub, WB., Khyatti, M., Dahmoul, S., Ayad, M., Maachi, F., Bedadra, W., Abdoun, M., Mesli, S., Hamdi-Cherif, M., Boualga, K., Bouaouina, N., Chouchane, L., Benider, A., Ben Ayed, F., Goldgar, D., and Corbex, M. Dietary risk factors for nasopharyngeal carcinoma in Maghreb countries. *Int J Cancer*. (2007) 1; 121(7):1550-5.
- Feng, BJ., Khyatti, M., Ben-Ayoub, W., Dahmoul, S., Ayad, M., Maachi, F., Bedadra, W., Abdoun, M., Mesli, S., Bakkali, H., Jalbout, M., Hamdi-Cherif, M., Boualga, K., Bouaouina, N., Chouchane, L., Benider, A., Ben-Ayed, F., Goldgar, DE., and Corbex, M. Cannabis, tobacco and domestic fumes intake are associated with nasopharyngeal carcinoma in North Africa. *Br J Cancer* (2009), 6;101(7):1207-12.
- Fenoglio-Preiser, N., Munoz, F., Carneiro, SM., Powell, P., Correa, M., Rugge, P., Guilford, M., Sasak, R., Lambert, M., Stolte, F., Megraud, H., and Watanabe. Gastric carcinoma. In Hamilton SR, Aoltonen LA. World Health organization classification tumors. *Pathology and genetics of tumors of the digestive system* Lyon IARC press (2000), 37-52.
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, DM., Forman, D., and Bray, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* (2015), 1; 136(5):E359-86.
- Fingerroth, JD., Diamond, ME., Sage, DR., Hayman, J., and Yates, JL. CD21-Dependent infection of an epithelial cell line, 293, by Epstein-Barr virus. *J Virol* (1999), 73(3):2115-25.
- Fingerroth, JD., Weiss, JJ., Tedder, TF., Strominger, JL., Biro, PA., and Fearon, DT. Epstein-Barr virus receptor of human B cells is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci USA* (1984), 81:4510-4516. 13.
- Fiorini, S., and Ooka, T. Secretion of Epstein-Barr virus-encoded BARTF1 oncoprotein from latently infected B cells. *Virol. J* (2008), 4. 5:70.
- Fish, K., Chen, J., and Longnecker, R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A enhances MYC-driven cell cycle progression in a mouse model of B lymphoma. *Blood* (2014), 23; 123(4):530-40.
- Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, MF., Allen, C., Hansen, G., Woodbrook, R., Wolfe, C., Hamadeh, RR, et al. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* (2015), 1(4):505-27.
- Flanagan, J., Middeldorp, J., and Sculley, T. Localization of the Epstein-Barr virus protein LMP 1 to exosomes. *J Gen Virol* (2003), 84(Pt 7):1871-9.
- Flavell, JR., Baumforth, KR., Wood, VH., Davies, GL., Wei, W., Reynolds, GM., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, GL., Young, LS., and Murray, PG . Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. *Blood* (2008), 111:292-301.
- Fléjou, JF. WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition. *Ann Pathol* (2011), 31(5 Suppl):S27-31.
- Fock, KM. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* (2014), 40(3):250-60.

- Fogg, MH., Kaur, A., Cho, YG., and Wang, F. The CD8+ T-cell response to an Epstein–Barr virus-related gammaherpesvirus infecting rhesus macaques provides evidence for immune evasion by the EBNA-1 homologue. *J Virol* (2005), 79:12681–12691.
- Fok, V., Friend, K., and Steitz, JA. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol* (2006) (a), 8; 173(3):319-25.
- Fok, V., Mitton-Fry, RM., Grech, A., and Steitz, JA. Multiple domains of EBER 1, an Epstein-Barr virus noncoding RNA, recruit human ribosomal protein L22. *RNA* (2006) (b), 12(5):872-82.
- Fotheringham, JA., Mazzucca, S., and Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A-induced DeltaNp63alpha expression is associated with impaired epithelial-cell differentiation. *Oncogene* (2010), 29; 29(30):4287-96.
- Fox, JG., and Wang, TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest* (2007), 117(1):60-9.
- Fox, JG., Dangler, CA., Taylor, NS., King, A., Koh, TJ., and Wang, TC. High-salt diet induces gastric epithelial hyperplasia and parietal cell loss, and enhances *Helicobacter pylori* colonization in C57BL/6 mice. *Cancer Res* (1999), 1; 59(19):4823-8.
- Frappier, L. EBNA1. *Curr Top Microbiol Immunol* (2015), 391:3-34.
- Frappier, L. Role of EBNA1 in NPC tumourigenesis. *Semin Cancer Biol* (2012), 22:154–161.
- Fries, KL., Sculley, TB., Webster-Cyriaque, J., Rajadurai, P., Sadler, RH., and Raab-Traub, N. Identification of a novel protein encoded by the BamHI A region of the Epstein-Barr virus. *J Virol* (1997), 71(4):2765-71.
- Fukayama, M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* (2010), 60(5):337-50.
- Fukayama, M., and Ushiku, T. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Pathol Res Pract* (2011), 15; 207(9):529-37.
- Fukayama, M., Hayashi, Y., Iwasaki, Y., Chong, J., Ooba, T., Takizawa, T., Koike, M., Mizutani, S., Miyaki, M., and Hirai, K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* (1994), 71(1):73-81.
- Fukayama, M., Hino, R., and Uozaki, H. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma: virus-host interactions leading to carcinoma. *Cancer Sci* (2008), 99(9):1726-33.
- Fukuda, M., and Longnecker, R. Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol3-kinase/Akt pathway. *J Virol* (2004), 78(4):1697-705.

G

- Gaddy, JA., Radin, JN., Loh, JT., Zhang, F., Washington, MK., Peek RM, Jr., Algood, HM., and Cover, TL. High dietary salt intake exacerbates *Helicobacter pylori*-induced gastric carcinogenesis. *Infect Immun* (2013), 81(6):2258-67.
- Galetsky, SA., Tsvetnov, VV., Land, CE., Afanasieva, TA., Petrovichev, NN., Gurtsevitch, VE., and Tokunaga, M. Epstein-Barr-virus-associated gastric cancer in Russia. *Int J Cancer* (1997), 10; 73(6):786-9.
- Genitsch, V., Novotny, A., Seiler, CA., Kröll, D., Walch, A., and Langer, R. Epstein-barr virus in gastro-esophageal adenocarcinomas - single center experiences in the context of current literature. *Front Oncol* (2015), 26; 5:73.

- Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M., and Hammerschmidt, W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interact with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo J* (1999), 1; 18(11): 3064-73.
- Gratama, JW., Oosterveer, MA., Zwaan, FE., Lepoutre, J., Klein, G., and Ernberg, I. Eradication of Epstein-Barr virus by allogeneic bone marrow transplantation: implications for sites of viral latency. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1988), 85(22):8693-6.
- Gregorovic, G., Bosshard, R., Karstegl, CE., White, RE., Pattle, S., Chiang, AK., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., and Farrell, PJ. Cellular gene expression that correlates with EBER expression in Epstein-Barr Virus-infected lymphoblastoid cell lines. *J Virol* (2011), 85(7):3535-45.
- Grimm, T., Schneider, S., Naschberger, E., Huber, J., Guenzi, E., Kieser, A., Reitmeir, P., Schulz, TF., Morris, CA., and Stürzl, M. EBV latent membrane protein-1 protects B cells from apoptosis by inhibition of BAX. *Blood* (2005), 15; 105(8):3263-9.
- Gruhne, B., Sompallae, R., and Masucci, MG. Three Epstein-Barr virus latency proteins independently promote genomic instability by inducing DNA damage, inhibiting DNA repair and inactivating cell cycle checkpoints. *Oncogene*. (2009)12; 28(45):3997-4008.
- Guerreiro-Cacais, AO., Li, L., Donati, D., Bejarano, MT., Morgan, A., Masucci, MG., Hutt-Fletcher, L., and Levitsky, V. Capacity of Epstein-Barr virus to infect monocytes and inhibit their development into dendritic cells is affected by the cell type supporting virus replication. *J Gen Virol* (2004), 85(Pt 10):2767-78.
- Gulley, ML. Genomic assays for Epstein-Barr virus-positive gastric adenocarcinoma. *Exp Mol Med* (2015), 23; 47:e134.
- Gulley, ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* (2001), 3(1):1-10.
- Gulley, ML., Glaser, SL., Craig, FE., Borowitz, M., Mann, RB., Shema, SJ., and Ambinder, RF. Guidelines for interpreting EBER in situ hybridization and LMP1 immunohistochemical tests for detecting Epstein-Barr virus in Hodgkin lymphoma. *Am J Clin Pathol* (2002), 117(2):259-67.
- Gulley, ML., Pulitzer, DR., Eagan, PA., and Schneider, BG. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl-2 expression and p53 accumulation. *Hum Pathol* (1996), 27(1):20-7.
- Gutzeit, C., Nagy, N., Gentile, M., Lyberg, K., Gumz, J., Vallhov, H., Puga, I., Klein, E., Gabrielsson, S., Cerutti, A., and Scheynius, A. Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. *J Immunol* (2014), 15; 192(12):5852-6.

H

- Haan, KM., Kwok, WW., Longnecker, R., and Speck, P. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* (2000), 74: 2451-4.
- Hadinoto, V., Shapiro, M., Sun, CC., and Thorley-Lawson, DA. The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS Pathog* (2009), 5(7):e1000496.

- Hamdi Cherif, M., Serraino, D., Mahnane, A., Laouamri, S., Zaidi, Z., Boukharouba, H., Cherka, D., Rakeb, M., Kara, L., Ayat, A., Birri, S., Virdone, S., De Paoli, P., and Bidoli, E. Time trends of cancer incidence in Setif, Algeria, 1986-2010: an observational study. *BMC Cancer* (2014), 30; 14:637.
- Hamdi-Cherif, M., Sekfali, N., and Coleman, MP. Incidence of cancer in the wilaya of Setif, Algeria. *Bull Cancer*. (1991); 78(2):155-67.
- Hamilton-Dutoit, SJ., and Pallesen, G. Detection of Epstein-Barr virus small RNAs in routine paraffin sections using non-isotopic RNA/RNA in situ hybridization. *Histopathology* (1994), 25 (2): 101–111.
- Hammerschmidt, W., and Sugden, B. Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* (1989), 3; 340(6232):393-7.
- Haneklaus, M., Gerlic, M., Kurowska-Stolarska, M., Rainey, AA., Pich, D., McInnes, IB., Hammerschmidt, W., O'Neill, LA., and Masters, SL. Cutting edge: miR-223 and EBV miR-BART15 regulate the NLRP3 inflammasome and IL-1 β production. *J Immunol* (2012), 15; 189(8):3795-9.
- Hadhri-Guiga, B., Khabir, AM., Mokdad-Gargouri, R., Ghorbel, AM., Drira, M., Daoud, J., Frikha, M., Jlidi, R., and Gargouri, A. Various 30 and 69 bp deletion variants of the Epstein-Barr virus LMP1 may arise by homologous recombination in nasopharyngeal carcinoma of Tunisian patients. *Virus Res* (2006), 115(1):24–30.
- Hao, Z., Koriyama, C., Akiba, S., Li, J., Luo, X., Itoh, T., Eizuru, Y., and Zou, J. The Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Southern and Northern China. *Oncol Rep* (2002), 9:1293–1298.
- Happel, C., Ramalingam, D., and Ziegelbauer, JM. Virus-Mediated Alterations in miRNA Factors and Degradation of Viral miRNAs by MCP1. *PLoS Biol* (2016), 28; 14(11):e2000998.
- Hashmi, AA., Hussain, ZF., Hashmi, KA., Zafar, MI., Edhi, MM., Faridi, N., and Khan, M. Latent membrane protein 1 (LMP1) expression in Hodgkin lymphoma and its correlation with clinical and histologic parameters. *World J Surg Oncol*. (2017) 20;15(1):89.
- Hebner, C., Lasanen, J., Battle, S., and Aiyar, A. 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 (2003), 263–74.
- Henderson, S., Rowe, M., Gregory, C., Croom-Carter, D., Wang, F., Longnecker, R., Kieff, E., and Rickinson, A. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* (1991), 28; 65(7):1107-15.
- Henle, G., and Henle, W. Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J Bacteriol* (1966), 91(3):1248-56.
- Henle, G., Henle, W., and Diehl, V. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1968), 59(1):94-101.
- Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., and Henle, G. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* (1967), 1; 157(3792):1064-5.
- Henson, BW., Perkins, EM., Cothran, JE., and Desai, P. Self-assembly of Epstein-Barr virus capsids. *Journal of virology* (2009), 83(8): p 3877-90.

- Herbert, KM., and Pimienta, G. Consideration of Epstein-Barr Virus-Encoded Noncoding RNAs EBER1 and EBER2 as a Functional Backup of Viral Oncoprotein Latent Membrane Protein 1. *MBio* (2016), 7(1):01926-15.
- Herbst, RS., Soria, JC., Kowanetz, M., Fine, GD., Hamid, O., Gordon, MS., Sosman, JA., McDermott, DF., Powderly, JD., Gettinger, SN., Kohrt, HE., Horn, L., Lawrence, DP., Rost, S., Leabman, M., Xiao, Y., Mokatrín, A., Koeppen, H., Hegde, PS., Mellman, I., Chen, DS., and Hodi, FS. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature* (2014), 27; 515(7528):563-7.
- Herndier, BG., Sanchez, HC., Chang, KL., Chen, YY., and Weiss, LM. High prevalence of Epstein-Barr virus in the Reed-Sternberg cells of HIV-associated Hodgkin's disease. *Am J Pathol.* (1993);142(4):1073-9.
- Herrera-Goepfert, R., Akiba, S., Koriyama, C., Ding, S., Reyes, E., Itoh, T., Minakami, Y., and Eizuru, Y. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: Evidence of age-dependence among a Mexican population. *World J Gastroenterol* (2005), 11:6096-103.
- Herrmann, K., and Niedobitek, G. Epstein-Barr virus-associated carcinomas: facts and fiction. *J Pathol* (2003), 199 (2): 140-5.
- Hertle, ML., Popp, C., Petermann, S., Maier, S., Kremmer, E., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. Differential gene expression patterns of EBV infected EBNA-3A positive and negative human B lymphocytes. *PLoS Pathog* (2009), 5(7):e1000506.
- Hino, R., Uozaki, H., Inoue, Y., Shintani, Y., Ushiku, T., Sakatani, T., Takada, K., and Fukayama, M. Survival advantage of EBV-associated gastric carcinoma: surviving up-regulation by viral latent membrane protein 2A. *Cancer Res* (2008), 1; 68(5):1427-35.
- Hino, R., Uozaki, H., Murakami, N., Ushiku, T., Shinozaki, A., Ishikawa, S., Morikawa, T., Nakaya, T., Sakatani, T., Takada, K., and Fukayama, M. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV latent membrane protein 2A leads to promoter hypermethylation of PTEN gene in gastric carcinoma. *Cancer Res* (2009), 1; 69(7):2766-74.
- Hochberg, D., Middeldorp, JM., Catalina, M., Sullivan, JL., Luzuriaga, K., and Thorley-Lawson, DA. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004), 101:239-44.
- Hoebe, EK., Le Large, TY., Tarbouriech, N., Oosterhoff, D., De Gruijl, TD., Middeldorp, JM., and Greijer, AE. Epstein-Barr virus-encoded BARTF1 protein is a decoy receptor for macrophage colony stimulating factor and interferes with macrophage differentiation and activation. *Viral Immunol* (2012), 25:461-470.
- Holmgren, L., Szeles, A., Rajnavolgyi, E., Folkman, J., Klein, G., Ernberg, I., and Falk, KI. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood* (1999), 93: 3956-63.
- Hong, SY., Yoon, WH., Park, JH., Kang, SG., Ahn, JH., and Lee, TH. Involvement of two NF-kappa B binding elements in tumor necrosis factor alpha-, CD40-, and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1-mediated induction of the cellular inhibitor of apoptosis protein 2 gene. *J Biol Chem* (2000), 275 : 18022-8.
- Hoshikawa, Y., Satoh, Y., Murakami, M., Maeta, M., Kaibara, N., Ito, H., Kurata, T. and Sairenji, T. Evidence of lytic infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV positive gastric carcinoma. *J Med Virol* (2002), 66, 351-9.

- Houali, K., Wang, X., Shimizu, Y., Djennaoui, D., Nicholls, J., Fiorini, S., Bouguermouh, A., and Ooka, T. A new diagnostic marker for secreted Epstein-Barr virus encoded LMP1 and BARF1 oncoproteins in the serum and saliva of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* (2007), 1; 13(17):4993-5000.
- Houmani, JL., and Ruf, IK. Clusters of basic amino acids contribute to RNA binding and nucleolar localization of ribosomal protein L22. *PLoS One* (2009), 4(4):e5306.
- Houmani, JL., Davis, CI., and Ruf, IK. Growth-promoting properties of Epstein-Barr virus EBER-1 RNA correlate with ribosomal protein L22 binding. *J Virol* (2009), 83(19):9844-53.
- Howe, JG., and Shu, MD. Epstein-Barr virus small RNA (EBER) genes: unique transcription units that combine RNA polymerase II and III promoter elements. *Cell* (1989), 2; 57(5):825-34.
- Howson, CP., Hiyama, T., and Wynder, EL. The decline in gastric cancer: epidemiology of an unplanned triumph. *Epidemiol Rev* (1986), 8:1-27.
- Hu, B., El Hajj, N., Sittler, S., Lammert, N., Barnes, R., and Meloni-Ehrig, A. Gastric cancer: Classification, histology and application of molecular pathology. *J Gastrointest Oncol* (2012), 3(3):251-61.
- Hu, LF., Chen, F., Zheng, X., Ernberg, I., Cao, SL., Christensson, B., Klein, G., and Winberg, G. Clonability and tumorigenicity of human epithelial cells expressing the EBV encoded membrane protein LMP1. *Oncogene* (1993), 8(6):1575-83.
- Hu, LF., Zabarovsky, ER., Chen, F., Cao, SL., Ernberg, I., Klein, G., and Winberg, G. Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol* (1991), 72 (Pt 10):2399-409.
- Hungermann, D., Müller, S., Spieker, T., Lisner, R., Niedobitek, G., and Herbst, H. Low prevalence of latently Epstein-Barr virus-infected cells in chronic gastritis. *Microsc Res Tech.* (2001) 15;53(6):409-13
- Hundahl, SA., Phillips, JL., and Menck, HR. The National Cancer Data Base Report on poor survival of U.S. gastric carcinoma patients treated with gastrectomy: Fifth Edition American Joint Committee on Cancer staging, proximal disease, and the "different disease" hypothesis. *Cancer* (2000), 15; 88(4):921-32.
- Hussain, T., and ulherkar, R. Lymphoblastoid Cell lines: a Continuous in Vitro Source of Cells to Study Carcinogen Sensitivity and DNA Repair. *Int J Mol Cell Med* (2012), 1(2):75-87.
- Hutt-Fletcher LM. EBV glycoproteins: where are we now? *Future Virol.* (2015); 10(10):1155-1162
- Hutt-Fletcher, LM. Epstein-Barr virus entry. *J Virol* (2007), 81(15):7825-32.
- Hutt-Fletcher, LM., and Lake, CM. Two Epstein-Barr virus glycoprotein complexes. *Curr Top Microbiol Immunol* (2001), 258:51-64. Review
- Hutzinger, R., Feederle, R., Mrazek, J., Schiefermeier, N., Balwierz, PJ., Zavolan, M., Polacek, N., Delecluse, HJ., and Hüttenhofer, A. Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome. *PLoS Pathog* (2009), 5(8):e1000547.

I

- IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* (2010), 94: v-vii, 1-412.
- IARC, Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Biological Agents: International Agency for Research on Cancer. (2012). (IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 100B.) Lyon. France.
- Iizasa, H., Nanbo, A., Nishikawa, J., Jinushi, M., and Yoshiyama, H. Epstein-Barr Virus (EBV)-associated gastric carcinoma. *Viruses* (2012), 4(12):3420-39.
- Ikeda, A., Caldwell, RG., Longnecker, R., Ikeda, M. Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol* (2003), 77(9):5529-34.
- Ikeda, A., Merchant, M., Lev, L., Longnecker, R., and Ikeda, M. Latent membrane protein 2A, a viral B cell receptor homologue, induces CD5+ B-1 cell development. *J Immunol* (2004), 1;172(9):5329-37.
- Ikeda, M., and Longnecker, R. Cholesterol is Critical for Epstein - Barr virus Latent Membrane Protein 2A Trafficking and Protein Stability. *Virology* (2007), 360(2):461-468.
- Imai, S., Koizumi, S., Sugiura, M., Tokunaga, M., Uemura, Y., Yamamoto, N., Tanaka, S., Sato, E., and Osato, T. Gastric carcinoma: monoclonal epithelial malignant cells expressing Epstein-Barr virus latent infection protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994), 13; 91(19):9131-5.
- Imai, S., Nishikawa, J., and Takada, K. Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* (1998), 72(5):4371-8.
- Inman, GJ., and Farrell, PJ. Epstein-Barr virus EBNA-LP and transcription regulation properties of pRB, p107 and p53 in transfection assays. *J Gen Virol* (1995), 76 2141-9.
- Ishaq, S., and Nunn, L. Helicobacter pylori and gastric cancer: a state of the art review. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* (2015); 8(Suppl 1):S6-S14.
- Isobe, Y., Sugimoto, K., Yang, L., Tamayose, K., Egashira, M., Kaneko, T., Takada, K., and Oshimi, K. Epstein-Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res* (2004), 15; 64(6):2167-74.
- Israel, B., and Kenney, S. EBV Lytic infection. In: E. Robertson (Ed), Epstein - Barr virus, Caister Academic Press, Philadelphia, Pennsylvania, USA, (2005), pp. 571-613.
- Iwakiri, D. Epstein-Barr Virus-Encoded RNAs: Key Molecules in Viral Pathogenesis. *Cancers (Basel)* (2014), 6; 6(3):1615-30.
- Iwakiri, D., and Takada, K. Epstein-Barr virus and gastric cancer. In: Robertson ES, ed. Epstein - Barr virus. Norfolk: *Caister Academic Press* (2005), 157-69.
- Iwakiri, D., and Takada, K. Role of EBERs in the pathogenesis of EBV infection. *Adv Cancer Res* (2010), 107:119-36
- Iwakiri, D., Eizuru, Y., Tokunaga, M., and Takada, K. Autocrine growth of Epstein-Barr virus-positive gastric carcinoma cells mediated by an Epstein-Barr virus-encoded small RNA. *Cancer Res* (2003), 63:7062-7067.
- Iwakiri, D., Zhou, L., Samanta, M., Matsumoto, M., Ebihara, T., Seya, T., Imai, S., Fujieda, M., Kawa, K., and Takada, K. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded small RNA is released

from EBV-infected cells and activates signaling from Toll-like receptor 3. *J Exp Med* (2009), 28; 206(10):2091-9.

Izumi, KM., and Kieff, ED. The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997)(a), 11; 94(23):12592-7.

Izumi, KM., Cahir, MC., Farland, ED., Riley, EA., Rizzo, D., Chen, Y., and Kieff, E. The residues between the two transformation effector sites of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 are not critical for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol*. (1999), 73(12):9908-16.

Izumi, KM., Kaye, KM., and Kieff, ED. The Epstein-Barr virus LMP1 amino acid sequence that engages tumor necrosis factor receptor associated factors is critical for primary B lymphocyte growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1997)(b), 94: 1447-52.

J

Jácome, AA., Lima, EM., Kazzi, AI., Chaves, GF., Mendonça, DC., and Maciel, MM. Santos JS. Epstein-Barr virus-positive gastric cancer: a distinct molecular subtype of the disease. *Rev Soc Bras Med Trop* (2016), 49(2):150-7.

Jakszyn, P., Bingham, S., Pera, G., Agudo, A., Luben, R., Welch, A., Boeing, H., Del Giudice, G., Palli, D., Saieva, C., Krogh, V., Sacerdote, C., Tumino, R., Panico, S., Berglund, G., Simán, H., Hallmans, G., Sanchez, MJ., Larrañaga, N., Barricarte, A., Chirlaque, MD., Quirós, JR., Key, TJ., Allen, N., Lund, E., Carneiro, F., Linseisen, J., Nagel, G., Overvad, K., Tjønneland, A., Olsen, A., Bueno-de-Mesquita, HB., Ocké, MO., Peeters, PH., Numans, ME., Clavel-Chapelon, F., Trichopoulou, A., Fenger, C., Stenling, R., Ferrari, P., Jenab, M., Norat, T., Riboli, E., and Gonzalez, CA. Endogenous versus exogenous exposure to N-nitroso compounds and gastric cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-EURGAST) study. *Carcinogenesis* (2006), 27(7):1497-501.

Jansson, A., Johansson, P., Li, S., and Rymo, L. Activity of the LMP1 gene promoter in Epstein-Barr virus-transformed cell lines is modulated by sequence variations in the promoter-proximal CRE site. *J. Gen. Virol* (2007) (a), 88:1887-1894.

Jansson, A., Johansson, P., Yang, W., Palmqvist, L., Sjöblom-Hallen, A., and Rymo, L. Role of a consensus AP-2 regulatory sequence within the Epstein-Barr virus LMP1 promoter in EBNA2 mediated transactivation. *Virus Genes* (2007) (b), 35:203-214.

Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W., and Delecluse, HJ. Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* (2000), 74(21):10142-52.

Jemal, A., Center, MM., DeSantis, C., and Ward, EM. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2010), 19(8):1893-907.

Jiang, R., Cabras, G., Sheng, W., Zeng, Y., and Ooka, T. Synergism of BARF1 with Ras induces malignant transformation in primary primate epithelial cells and human nasopharyngeal epithelial cell Neoplasia (2009), 11(9):964-73.

- Johannsen, E., Luftig, M., Chase, MR., Weicksel, S., Cahir-McFarland, E., Illanes, D., Sarracino, D., and Kieff, E. Proteins of purified Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2004), 16; 101(46):16286-91.
- Jolissaint, L., de Pauw, A., and Buecher, B. Les formes héréditaires et familiales des cancers de l'estomac Hereditary and familial forms of gastric cancer. *Cancéro dig* (2011), 3; (2) :101-107.
- Jones, MD., and Griffin, BE. Clustered repeat sequences in the genome of Epstein Barr virus. *Nucleic Acids Res.* (1983) 25; 11(12):3919-37.
- Junker, AK., Thomas, EE., Radcliffe, A., Forsyth, RB., Davidson, AG., and Rymo, L. Epstein-Barr virus shedding in breast milk. *Am J Med Sci* (1991), 302(4):220-3.
- Just, T., Burgwald, H., and Broe, MK. Flow cytometric detection of EBV (EBER snRNA) using peptide nucleic acid probes. *J Virol Methods.* (1998) ;73(2):163-74

K

- Kaizaki, Y., Sakurai, S., Chong, JM., and Fukayama, M. Atrophic gastritis, Epstein-Barr virus infection, and Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastric Cancer* (1999), 2(2):101-108.
- Kamangar, F., Cheng, C., Abnet, CC., and Rabkin, CS. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk--a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006), 15(10):1920-8.
- Kaneda, A., Matsusaka, K., Aburatani, H., and Fukayama, M. Epstein-Barr virus infection as an epigenetic driver of tumorigenesis. *Cancer Res* (2012), 15; 72(14):3445-50.
- Kanegane, H., Bhatia, K., Gutierrez, M., Kaneda, H., Wada, T., Yachie, A., Seki, H., Arai, T., Kagimoto, S., Okazaki, M., Oh-ishi, T., Moghaddam, A., Wang, F., and Tosato, G. A syndrome of peripheral blood T-cell infection with Epstein-Barr virus (EBV) followed by EBV-positive T-cell lymphoma. *Blood* (1998)(a), 15; 91(6):2085-91.
- Kanegane, H., Miyawaki, T., Yachie, A., Oh-Ishi, T., Bhatia, K., and Tosato, G. Development of EBV-positive T-cell lymphoma following infection of peripheral blood T cells with EBV. *Leuk Lymphoma* (1999), 34(5-6):603-7.
- Kanegane, H., Yachie, A., Miyawaki, T., and Tosato, G. EBV-NK cells interactions and lymphoproliferative disorders. *Leuk Lymphoma* (1998)(b), 29(5-6):491-8.
- Kang, D., Skalsky, RL., and Cullen, BR. EBV BART MicroRNAs Target Multiple Pro-apoptotic Cellular Genes to Promote Epithelial Cell Survival. *PLoS Pathog* (2015), 12; 11(6):e1004979.
- Kang, GH., Lee, S., Kim, WH., Lee, HW., Kim, JC., Rhyu, MG., Ro, JY. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma. *Am J Pathol* (2002), 160(3):787-94.
- Kang, MS., and Kieff, E. Epstein-Barr virus latent genes. *Exp Mol Med* (2015), 23; 47:e131.
- Kapsogeorgou, EK., Abu-Helu, RF., Moutsopoulos, HM., and Manoussakis, MN. Salivary gland epithelial cell exosomes: A source of autoantigenic ribonucleoproteins. *Arthritis Rheum* (2005), 52(5):1517-21.

- Karimi, P., Islami, F., Anandasabapathy, S., Freedman, ND., and Kamangar, F. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2014), 23(5):700-13.
- Kato, S., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tanaka, H., Kumagai, T., Ota, H., Katsuyama, T., Asaka, M., and Tatematsu, M. High salt diets dose-dependently promote gastric chemicalcarcinogenesis in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils associated with a shift in mucin production from glandular to surface mucous cells. *Int J Cancer* (2006), 1; 119(7):1558-66.
- Katona, BW., and Rustgi, AK. Gastric Cancer Genomics: Advances and Future Directions. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* (2017), 14; 3(2):211-217.
- Kaye, KM., Izumi, KM., and Kieff, E. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 is essential for B-lymphocytes growth transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* (1993), 90:9150-9.
- Kaye, KM., Izumi, KM., Li, H., Johannsen, E., Davidson, D., Longnecker, R., and Kieff, E. An Epstein-Barr virus that expresses only the first 231 LMP1 amino acids efficiently initiates primary B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* (1999), 73(12):10525-30.
- Kawabe, S., Ito, Y., Gotoh, K., Kojima, S., Matsumoto, K., Kinoshita, T., Iwata, S., Nishiyama, Y., Kimura, H. Application of flow cytometric in situ hybridization assay to Epstein-Barr virus-associated T/natural killer cell lymphoproliferative diseases. *Cancer Sci.* (2012)103(8):1481-8.
- Kempkes, B., and Ling, PD. EBNA2 and Its Coactivator EBNA-LP. *Curr Top Microbiol Immunol* (2015), 391:35-59.
- Kempkes, B., and Robertson, ES. Epstein-Barr virus latency: current and future perspectives. *Curr Opin Virol* (2015), 14:138-44.
- Khan, G., and Hashim, MJ. Global burden of deaths from Epstein-Barr virus attributable malignancies 1990-2010. *Infect Agent Cancer* (2014), 17; 9(1):38.
- Khan, G., Coates, PJ., Kangro, HO., and Slavin, G. Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes. *J Clin Pathol* (1992), 45(7):616-20.
- Khanna R, Moss D, Gandhi M. Technology insight: Applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Mar;2(3):138-49
- Khanna R, Moss D, Gandhi M. Technology insight: Applications of emerging immunotherapeutic strategies for Epstein-Barr virus-associated malignancies. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Mar;2(3):138-49
- Kieff, E. Epstein Barr-Virus and its replication. In: Fildes BN. Knipe DM, Howley PM, eds. *Virology*. Philadelphia. *Ravast press* (1996), 2343-96.
- Kieff, E. Epstein - Barr virus and its replication. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins (2007).
- Kieff, E., and Rickinson, A. Epstein-Barr Virus and Its Replication. In: Howley P, Knipe D, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: *Lippincott Williams & Wilkins* (2007), pp 2603–2654.
- Kieff, E., and Rickinson, A. *Fields Virology*. 4th edn. Knipe DM and Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers: Philadelphia, (2001). pp. 2511–2574.

- Kieff, E., and Rickinson, AB (eds). Epstein - Barr virus and Its Replication. Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, PA, USA, (2006).
- Kieser, A., and Sterz, KR. The Latent Membrane Protein 1 (LMP1). *Curr Top Microbiol Immunol.* (2015); 391:119-49.
- Kijima, Y., Hokita, S., Takao, S., Baba, M., Natsugoe, S., Yoshinaka, H., Aridome, K., Otsuji, T., Itoh, T., Tokunaga, M., Eizuru, Y., and Aikou, T. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol* (2001), 64(4): 513–18.
- Kim, RH., Chang, MS., Kim, HJ., Song, KS., Kim, YS., Choi, BY., and Kim, WH. Medical history and lifestyle factors contributing to Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and conventional gastric carcinoma in Korea. *Anticancer Res* (2010), 30(6):2469-75.
- Kim, HS., Kim, JS., Kim, JS., Park, JT., Lee, MC., Juhng, SW., Cho, JH., and Park, CS. The association between CD99 and LMP-1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Exp Oncol.* (2006).28(1):40-3.
- Kimura, H., Miyake, K., Yamauchi, Y., Nishiyama, K., Iwata, S., Iwatsuki, K., Gotoh, K., Kojima, S., Ito, Y., and Nishiyama, Y. Identification of Epstein-Barr virus (EBV)-infected lymphocyte subtypes by flow cytometric in situ hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis.* (2009)1;200(7):1078-87.
- Kitagawa, N., Goto, M., Kurozumi, K., Maruo, S., Fukayama, M., Naoe, T., Yasukawa, M., Hino, K., Suzuki, T., Todo, S., and Takada, K. Epstein-Barr virus-encoded poly(A)(-) RNA supports Burkitt's lymphoma growth through interleukin-10 induction. *EMBO J* (2000), 15; 19(24):6742-50.
- Kitamura, R., Sekimoto, T., Ito, S., Harada, S., Yamagata, H., Masai, H., Yoneda, Y., and Yanagi, K. 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 (2006), 1979–91.
- Knoop, AS., Knudsen, H., Balslev, E., Rasmussen, BB., Overgaard, J., Nielsen, KV., Schonau, A., Gunnarsdóttir, K., Olsen, KE., Mouridsen, H., Ejlertsen, B., and Danish Breast Cancer Cooperative Group. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil: Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* (2005), 20; 23(30):7483-90.
- Knox, PG., Li, QX., Rickinson, AB., and Young, LS. In vitro production of stable Epstein-Barr virus-positive epithelial cell clones which resemble the virus: cell interaction observed in nasopharyngeal carcinoma. *Virology* (1996), 1; 215(1):40-50.
- Kobayashi, M., Tsubono, Y., Sasazuki, S., Sasaki, S., and Tsugane, S. JPHC Study Group. Vegetables, fruit and risk of gastric cancer in Japan: a 10-year follow-up of the JPHC Study Cohort I. *Int J Cancer* (2002), 1; 102(1):39-44.
- Komano, J., Maruo, S., Kurozumi, K., Oda, T., and Takada, K. Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* (1999), 73(12):9827-31.

- Kondo, S., Wakisaka, N., Muramatsu, M., Zen, Y., Endo, K., Muro, S., Sugimoto, H., Yamaoka, S., Pagano, JS., and Yoshizaki, T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. *J Virol.* (2011); 85(21):11255-64.
- Kondo, S., Wakisaka, N., Muramatsu, M., Zen, Y., Endo, K., Muro, S., Sugimoto, H., Yamaoka, S., Pagano, JS., and Yoshizaki, T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces cancer stem/progenitor-like cells in nasopharyngeal epithelial cell lines. *J Virol.* (2011); 85(21):11255-64.
- Kondo, S., Wakisaka, N., Schell, MJ., Horikawa, T., Sheen, TS., Sato, H, Furukawa, M., Pagano, JS., and Yoshizaki, T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces the matrix metalloproteinase-1 promoter via an Ets binding site formed by a single nucleotide polymorphism: enhanced susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* (2005)20;115(3):368-76
- Kondo, S., Wakisaka, N., Schell, MJ., Horikawa, T., Sheen, TS., Sato, H, Furukawa, M., Pagano, JS., and Yoshizaki, T. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces the matrix metalloproteinase-1 promoter via an Ets binding site formed by a single nucleotide polymorphism: enhanced susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* (2005)20;115(3):368-76
- Koriyama, C., Akiba, S., Iriya, K., Yamaguti, T., Hamada, GS., Itoh, T., Eizuru, Y., Aikou, T., Watanabe, S., Tsugane, S., and Tokunaga, M., Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Japanese Brazilians and non-Japanese Brazilians in São Paulo. *Jpn J Cancer Res* (2001), 92(9):911-7.
- Koriyama, C., Akiba, S., Minakami, Y., and Eizuru, Y. Environmental factors related to Epstein-Barr virus-associated gastric cancer in Japan. *J Exp Clin Cancer Res* (2005), 24(4):547-53.
- Krejs, GJ. Gastric cancer: epidemiology and risk factors. *Dig Dis* (2010), 28 (4-5):600-3.
- Kung, CP., and Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *J Virol.* (2008);82(11):5486-93
- Kung, CP., and Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor through effects on Bcl-3 and STAT3. *J Virol.* (2008);82(11):5486-93

L

- La Vecchia, C., Negri, E., D'Avanzo, B., and Franceschi, S. Electric refrigerator use and gastric cancer risk. *Br J Cancer* (1990), 62(1):136-7.
- Laichalk, LL., and Thorley-Lawson, DA. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* (2005), 79(2):1296-307.
- Laing, KG., Elia, A., Jeffrey, I., Matys, V., Tilleray, VJ., Souberbielle, B., and Clemens, MJ. In vivo effects of the Epstein-Barr virus small RNA EBER-1 on protein synthesis and cell growth regulation. *Virology* (2002), 5; 297(2):253-69.
- Lauren, P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. an attempt at a histo-clinical classification. *Acta pathol microbiol scand* (1965), 64:31-49.

- Laux, G., Dugrillon, F., Eckert, C., Adam, B., Zimmer-Strobl, U., and Bornkamm, GW. 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* (1994), 68(11):6947-58.
- Laux, G., Perricaudet, M., and Farrell, PJ. A spliced Epstein-Barr virus gene expressed in immortalized lymphocytes is created by circularization of the linear viral genome. *EMBO J* (1988), 7: 769-774.
- Le Clorennec, C., Youlyouy-Marfak, I., Adriaenssens, E., Coll, J., Bornkamm, GW., and Feuillard, J. EBV latency III immortalization program sensitizes B cells to induction of CD95-mediated apoptosis via LMP1: role of NF-kappaB, STAT1, and p53. *Blood* (2006), 1; 107(5):2070-8.
- Le Roux, A., Kerdiles, B., Walls, D., Dedieu, JF., and Perricaudet, M. The Epstein-Barrvirus determined nuclear antigens EBNA-3A, -3B, and -3C repress EBNA-2-mediated transactivation of the viral terminal protein 1 gene promoter. *Virology* (1994), 205(2):596-602.
- Lee, HS., Chang, MS., Yang, HK., Lee, BL., and Kim, WH. Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with Epstein-barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res* (2004), 1; 10(5):1698-705.
- Lee, JH., Kim, SH., Han, SH., An, JS., Lee, ES., and Kim, YS. Clinicopathological and molecular characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma: a meta-analysis. *J Gastroenterol Hepatol* (2009) (a), 24, 354-65.
- Lee, JM., Kim, H., Noh, SH., Lee, WY., Kim, SJ., and Park, JH. Expression of Epstein - Barr virus Gene and Clonality of Infiltrated T Lymphocytes in Epstein-Barr Virus-associated Gastric Carcinoma. *Immune Netw* (2011), 11(1):50-8.
- Lee, JW., Liu, PF., Hsu, LP., Chen, PR., Chang, CH., and Shih, WL. EBV LMP-1 negatively regulates expression and pro-apoptotic activity of Par-4 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* (2009) (b), 8; 279(2):193-201.
- Lee, JY., Kim, KM., Min, BH., Lee, JH., Rhee, PL., and Kim, JJ. Epstein-Barr virus-associated lymphoepithelioma-like early gastric carcinomas and endoscopic submucosal dissection: case series. *World J Gastroenterol* (2014), 7; 20(5):1365-70.
- Lee, N., Moss, WN., Yario, TA., and Steitz, JA. EBV noncoding RNA binds nascent RNA to drive host PAX5 to viral DNA. *Cell*. (2015) 12; 160(4):607-18.
- Lee, N., Pimienta, G., and Steitz, JA. AUF1/hnRNP D is a novel protein partner of the EBER1 noncoding RNA of Epstein-Barr virus. *RNA* (2012), 18(11):2073-82.
- Lee, SA., Kang, D., Shim, KN., Choe, JW., Hong, WS., and Choi, H. Effect of diet and Helicobacter pylori infection to the risk of early gastric cancer. *J Epidemiol* (2003), 13(3):162-8.
- Lei, H., Li, T., Li, B., Tsai, S., Biggar, RJ., Nkrumah, F., Neequaye, J., Gutierrez, M., Epelman, S., Mbulaiteye, SM., Bhatia, K., and Lo, SC.. Epstein-Barr virus from Burkitt Lymphoma biopsies from Africa and South America share novel LMP-1 promoter and gene variations. *Sci Rep*. (2015) 23;5:16706.

- Leocata, P., Ventura, L., Giunta, M., Guadagni, S., Fortunato, C., Discepoli, S., and Ventura, T. [Gastric carcinoma: a histopathological study of 705 cases]. *Ann Ital Chir* (1998), 69(3):331-7.
- Levine, PH., Stemmermann, G., Lennette, ET., Hildesheim, A., Shibata, D., and Nomura, A. Elevated antibody titers to Epstein-Barr virus prior to the diagnosis of Epstein-Barr-virus-associated gastric adenocarcinoma. *Int J Cancer* (1995), 3; 60(5):642-4.
- Levitskaya, J., Coram, M., Levitsky, V., Imreh, S., Steigerwald-Mullen, PM., Klein, G., Kurilla, MG., and Masucci, MG. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* (1995), 22; 375(6533):685-8.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A., and Masucci, MG. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1997), 11; 94(23):12616-21.
- Li, J., Liu, X., Liu, M., Che, K., and Luo, B. Methylation and expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1, 2A and 2B in EBV-associated gastric carcinomas and cell lines. *Dig Liver Dis.* (2016); 48(6):673-80.
- Li, Q., Spriggs, MK., Kovats, S., Turk, SM., Comeau, MR., Nepom, B., and Hutt-Fletcher, LM. Epstein-Barr virus uses HLA class II as a cofactor for infection of B lymphocytes. *J Virol* (1997), 71(6):4657-4662.
- Li, W., Wu, BA., Zeng, YM., Chen, GC., Li, XX., Chen, JT., Guo, YW., Li, MH., and Zeng, Y. Epstein-Barr virus in hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* (2004), 1; 10(23):3409-13.
- Liang, Y., and Zhou, Z. [Research progress of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* (2016), 25; 19(3):355-60.
- Lima, VP., de Lima, MA., André, AR., Ferreira, MV., Barros, MA., and Rabenhorst, SH. H pylori (CagA) and Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas: correlation with p53 mutation and c-Myc, Bcl-2 and Bax expression. *World J Gastroenterol* (2008), 14; 14(6):884-91.
- Lin, CT., Lin, CR., Tan, GK., Chen, W., Dee, AN., and Chan, WY. The mechanism of Epstein-Barr virus infection in nasopharyngeal carcinoma cells. *Am J Pathol.* (1997);150(5):1745-56
- Lin, J., Johannsen, E., Robertson, E., and Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C putative repression domain mediates coactivation of the LMP1 promoter with EBNA-2. *J Virol* (2002), 76:232-42.
- Ling, PD., Peng, RS., Nakajima, A., Yu, JH., Tan, J., Moses, SM., Yang, WH., Zhao, B., Kieff, E., Bloch, KD., and Bloch, DB. Mediation of Epstein-Barr virus EBNA-LP transcriptional coactivation by Sp100. *EMBO J* (2005), 19; 24(20):3565-75.
- Liu, CD., Chen, YL., Min, YL., Zhao, B., Cheng, CP., Kang, MS., Chiu, SJ., Kieff, E., and Peng, CW. The nuclear chaperone nucleophosmin escorts an Epstein-Barr virus nuclear antigen to establish transcriptional cascades for latent infection in human B cells. *PLoS Pathogen* (2012), 8(12):e1003084.
- Liu, S., Wang, X., Shi, Y., Han, L., Zhao, Z., Zhao, C., and Luo, B. Toll-like receptor gene polymorphisms and susceptibility to Epstein-Barr virus-associated and -negative gastric carcinoma in Northern China. *Saudi J Gastroenterol* (2015), 21(2):95-103.

- Liu, X., Gao, Y., Luo, B., and Zhao, Y. Construction and anti-apoptosis activities of recombinant adenoviral Expression vector carrying EBV latent membrane protein 2A. *Gastroenterol Res Pract* (2011):182832.
- Liu, Y., Yang, W., Pan, Y., Ji, J., Lu, Z., and Ke, Y. Genome-wide analysis of Epstein-Barr virus (EBV) isolated from EBV-associated gastric carcinoma (EBVaGC). *Oncotarget*. (2016), 26; 7(4):4903-14.
- Lo, AK., Dawson, CW., Lo, KW., Yu, Y., and Young, LS. Upregulation of Id1 by Epstein-Barr virus-encoded LMP1 confers resistance to TGFbeta-mediated growth inhibition. *Mol Cancer* (2010), 18; 9:155.
- Lo, AK., Huang, DP., Lo, KW., Chui, YL., Li, HM., Pang, JC., and Tsao, SW. Phenotypic alterations induced by the Hong Kong-prevalent Epstein-Barr virus-encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells. *Int J Cancer* (2004), 10; 109(6):919-25.
- Lo, AK., Lo, KW., Ko, CW., Young, LS., and Dawson, CW. Inhibition of the LKB1-AMPK pathway by the Epstein-Barr virus-encoded LMP1 promotes proliferation and transformation of human nasopharyngeal epithelial cells. *J Pathol* (2013), 230(3):336-46.
- Lo, AK., To, KF., Lo, KW., Lung, RW., Hui, JW., and Liao, G. Hayward SD. Modulation of LMP1 protein expression by EBV-encoded microRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2007), 9; 104(41):16164-9.
- Loh, JT., Friedman, DB., Piazzuelo, MB., Bravo, LE., Wilson, KT., Peek RM, Jr., Correa, P., and Cover, TL. Analysis of Helicobacter pylori cagA promoter elements required for salt-induced upregulation of CagA expression. *Infect Immun* (2012), 80(9):3094-106.
- Loh, YH., Jakszyn, P., Luben, RN., Mulligan, AA., Mitrou, PN., and Khaw, KT. N-Nitroso compounds and cancer incidence: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk Study. *Am J Clin Nutr* (2011), 93(5):1053-61.
- Longnecker, RM., Kieff, E., and Cohen, JI. Epstein-Barr virus. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins (2013), pp. 1898-1959.
- Lu, CC., Jeng, YY., Tsai, CH., Liu, MY., Yeh, SW., Hsu, TY., and Chen, MR. Genome-wide transcription program and expression of the Rta responsive gene of Epstein-Barr virus. *Virology* (2006) (a), 345(2):358-372.
- Lu, J., Lin, WH., Chen, SY., Longnecker, R., Tsai, SC., Chen, CL., and Tsai, CH. Syk tyrosine kinase mediates Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A-induced cell migration in epithelial cells. *J Biol Chem* (2006) (b), 31; 281(13):8806-14.
- Lucchesi, W., Brady, G., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M., Russ, R., and Farrell, PJ. Differential gene regulation by Epstein-Barr virus type 1 and type 2 EBNA2. *J Virol* (2008), 82(15):7456-66.
- Lung, ML., Lam, WP., Sham, J., Choy, D., Yong-Sheng, Z., Guo, HY., and Ng, MH. Detection and prevalence of the "f" variant of Epstein-Barr virus in southern China. *Virology* (1991), 185(1):67-71.
- Lung, RW., Tong, JH., and To, KF. Emerging roles of small Epstein-Barr virus derived non-coding RNAs in epithelial malignancy. *Int J Mol Sci* (2013), 23; 14(9):17378-409.

- Luo, B., Masanao, M., Makoto, F., Kazuoshi, Y., and Takeshi, S. [CD21-independent infection of a human signet ring cell gastric carcinoma cell line by Epstein-Barr virus]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* (2004), 18(1):59-61.
- Luo, B., Wang, Y., Wang, XF., Gao, Y., Huang, BH., and Zhao, P. Correlation of Epstein-Barr virus and its encoded proteins with *Helicobacter pylori* and expression of c-met and c-myc in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* (2006), 28; 12(12):1842-8.
- Luo, B., Wang, Y., Wang, XF., Liang, H., Yan, LP., Huang, BH., and Zhao, P. Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* (2005), 7; 11(5):629-33.
- Lv, DW., Zhong, J., Zhang, K., Pandey, A., and Li, R. Understanding Epstein-Barr Virus Life Cycle with Proteomics: A Temporal Analysis of Ubiquitination During Virus Reactivation. *OMICS* (2017), 21(1):27-37.

M

- Maeda, E., Akahane, M., Uozaki, H., Kato, N., Hayashi, N., Fukayama, M., and Ohtomo, K. CT appearance of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Abdom Imaging*. (2009), 34(5):618-25.
- Mahjoub, F., Shahsiah, R., Ardalan, FA., Iravanloo, G., Sani, MN., Zarei, A., Monajemzadeh, M., Farahmand, F., and Mamishi, S. Detection of Epstein Barr virus by chromogenic in situ hybridization in cases of extra-hepatic biliary atresia. *Diagn Pathol* (2008), 28; 3:19.
- Maier, S., Staffler, G., Hartmann, A., Höck, J., Henning, K., Grabusic, K., Mailhammer, R., Hoffmann, R., Wilmanns, M., Lang, R., Mages, J., and Kempkes, B. Cellular target genes of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Journal of Virology* (2006), 80:9761–9771.
- Mainou, BA., Everly, DN Jr, and Raab-Traub, N. Unique signaling properties of CTAR1 in LMP1-mediated transformation. *J Virol.* (2007); 81(18):9680-92.
- Mainou, BA., Everly, DN Jr., and Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene* (2005), 20; 24(46):6917-24.
- Malik-Soni, N., and Frappier, L. Nucleophosmin contributes to the transcriptional activation function of the Epstein–Barr virus EBNA1 protein. *J Virol* (2014), 88:2323–2326.
- Malvezzi, M., Bonifazi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C., Decarli, A., and Negri, E. An age-period-cohort analysis of gastric cancer mortality from 1950 to 2007 in Europe. *Ann Epidemiol* (2010), 20(12):898-905.
- Mannick, JB., Cohen, JL., Birkenbach, M., Marchini, A., and Kieff, E. The Epstein–Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* (1991), 65:6826–6837.
- Manoury, B., and Fåhræus, R. Self-inhibition of EBNA-1 protein to escape from immune recognition. *Med Sci (Paris)* (2004), 20(1): 5-6.
- Marieb E et Hoehn K. Anatomie et physiologie humaine. 9^{ème} Edition américaine. (2014) Edition PEARSON.
- Marquitz, AR., and Raab-Traub, N. The role of miRNAs and EBV BARTs in NPC. *Semin Cancer Biol* (2012), 22(2):166-72.

- Marquitz, AR., Mathur, A., Chugh, PE., Dittmer, DP., and Raab-Traub, N. Expression profile of microRNAs in Epstein-Barr virus-infected AGS gastric carcinoma cells. *J Virol* (2014), 88(2):1389-93.
- Marquitz, AR., Mathur, A., Nam, CS., and Raab-Traub, N. The Epstein-Barr Virus BARTmicroRNAs target the pro-apoptotic protein Bim. *Virology* (2011), 10; 412(2):392-400.
- Martínez-López, JL., Torres, J., Camorlinga-Ponce, M., Mantilla, A., Leal, YA., and Fuentes-Pananá, EM. Evidence of Epstein-Barr virus association with gastric cancer and non-atrophic gastritis. *Viruses* (2014), 20; 6 (1):301-18.
- Marziliano, N., Arbustini, E., Rossi de Gasperis, M., and Crovella, S. Detection of Epstein Barr virus in formalin-fixed paraffin tissues by fluorescent direct in situ PCR. *Eur J Histochem.* (2005);49(3):309-12.
- Maruo, S., Zhao, B., Johannsen, E., Kieff, E., Zou, J., and Takada, K. Epstein-Barr virus nuclear antigens 3C and 3A maintain lymphoblastoid cell growth by repressing p16INK4A and p14ARF expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011), 1; 108(5):1919-24.
- Matsunou, H., Konishi, F., Hori, H., Ikeda, T., Sasaki, K., Hirose, Y., and Yamamichi, N. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma with lymphoid stroma in Japan. *Cancer* (1996), 15; 77(10):1998-2004.
- Matsusaka, K., Kaneda, A., Nagae, G., Ushiku, T., Kikuchi, Y., Hino, R., Uozaki, H., Seto, Y., Takada, K., Aburatani, H., and Fukayama, M. Classification of Epstein-Barr virus-positive gastric cancers by definition of DNA methylation epigenotypes. *Cancer Res* (2011), 1; 71(23):7187-97.
- McClellan, MJ., Khasnis, S., Wood, CD., Palermo, RD., Schlick, SN., Kanhere, AS., Jenner, RG., and West, MJ. Downregulation of integrin receptor-signaling genes by Epstein-Barr virus EBNA 3C via promoter-proximal and -distal binding elements. *J Virol* (2012), 86(9):5165-78.
- Miller, CL., Lee, JH., Kieff, E., and Longnecker, R. An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1994), 18; 91(2):772-6.
- Miller, G., and Lipman, M. Comparison of the yield of infectious virus from clones of human and simian lymphoblastoid lines transformed by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* (1973), 1; 138(6):1398-412.
- Miller, WE., Earp, HS., and Raab-Traub, N. The Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces expression of the epidermal growth factor receptor. *J Virol* (1995), 69(7):4390-8.
- Min, BH., Tae, CH., Ahn, SM., Kang, SY., Woo, SY., Kim, S., and Kim, KM. Epstein-Barr virus infection serves as an independent predictor of survival in patients with lymphoepithelioma-like gastric carcinoma. *Gastric Cancer* (2016), 19 (3):852-9.
- Moody, CA., Scott, RS., Amirghahari, N., Nathan, CO., Young, LS., Dawson, CW., and Sixbey, JW. Modulation of the cell growth regulator mTOR by Epstein-Barr virus-encoded LMP2A. *J Virol* (2005), 79(9):5499-506.
- Moritani, S., Kushima, R., Sugihara, H., and Hattori, T. Phenotypic characteristics of Epstein-Barr-virus-associated gastric carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* (1996), 122(12):750-6.

- Morris, MA, Dawson, CW, Laverick, L, Davis, AM, Dudman, JP, Raveenthiraraj, S, Ahmad, Z, Yap, LF, and Young, LS. The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF β and β 1 integrin signalling. *Sci Rep.* (2016) 19; 6:19533.
- Morris, MA, Dawson, CW, Laverick, L, Davis, AM, Dudman, JP, Raveenthiraraj, S, Ahmad, Z, Yap, LF, and Young, LS. The Epstein-Barr virus encoded LMP1 oncoprotein modulates cell adhesion via regulation of activin A/TGF β and β 1 integrin signalling. *Sci Rep.* (2016) 19; 6:19533.
- Morris, MA., Dawson, CW., Wei, W., O'Neil, JD., Stewart, SE., Jia, J., Bell, AI., Young, LS., and Arrand, JR. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 induces a hyperproliferative and inflammatory gene expression programme in cultured keratinocytes. *J Gen Virol.* (2008); 89 (Pt 11):2806-20.
- Morris, MA., Dawson, CW., Wei, W., O'Neil, JD., Stewart, SE., Jia, J., Bell, AI., Young, LS., and Arrand, JR. Epstein-Barr virus-encoded LMP1 induces a hyperproliferative and inflammatory gene expression programme in cultured keratinocytes. *J Gen Virol.* (2008); 89 (Pt 11):2806-20.
- Morrison, JA., and Raab-Traub, N. Roles of the ITAM and PY motifs of Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A in the inhibition of epithelial cell differentiation and activation of {beta}-catenin signaling. *J Virol* (2005), 79(4):2375-82.
- Mosialos, G., Birkenbach, M., Yalamanchili, R., VanArsdale, T., Ware, C., and Kieff, E. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* (1995), 10; 80(3):389-99.
- Moss, WN., Lee, N., Pimienta, G., and Steitz, JA. RNA families in Epstein-Barr virus. *RNA Biol* (2014), 11(1):10-7.
- Moy, KA., Fan, Y., Wang, R., Gao, YT., Yu, MC., and Yuan, JM. Alcohol and tobacco use in relation to gastric cancer: a prospective study of men in Shanghai, China. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2010), 19(9):2287-97.
- Murata, T., Sato, Y., and Kimura, H. Modes of infection and oncogenesis by the Epstein-Barr virus. *Rev Med Virol* (2014), 24(4):242-53.
- Murphy, G., Pfeiffer, R., Camargo, MC., and Rabkin, CS. Meta-analysis shows that prevalence of Epstein-Barr virus-positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* (2009), 137(3):824-33.
- Murray, RJ., Wang, D., Young, LS., Wang, F., Rowe, M., Kieff, E., and Rickison, AB. Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-cell recognition of transfectants expressing the virus-coded latent membrane protein LMP. *J Virol* (1988), 62:3747-3755.

N

- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* (2009), 23; 5(4):376-85.
- Nana-Sinkam, SP., and Croce, CM. Non-coding RNAs in cancer initiation and progression and as novel biomarkers. *Mol Oncol* (2011), 5(6):483-91.

- Nanbo, A., Inoue, K., Adachi-Takasawa, K., and Takada, K. Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* (2002), 1; 21(5):954-65.
- Nanbo, A., Kachi, K., Yoshiyama, H., and Ohba, Y. Epstein-Barr virus exploits host endocytic machinery for cell-to-cell viral transmission rather than a virological synapse. *J Gen Virol* (2016), 97 (11):2989-3006.
- Nanbo, A., Yoshiyama, H., and Takada, K. 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* (2005), 79(19):12280-5.
- Naumann, M., Sokolova, O., Tegtmeyer, N., and Backert, S. Helicobacter pylori: A paradigm Pathogen for Subverting Host Cell Signal Transmission. *Trends Microbiol* (2017), 2. 25(4):316-328.
- Niederman, JC., Miller, G., Pearson, HA., Pagano, JS., and Dowaliby, JM. Infectious mononucleosis. Epstein-Barr-virus shedding in saliva and the oropharynx. *N Engl J Med* (1976), 17; 294(25):1355-9.
- Niedobitek, G., and Herbst, H. Applications of in situ hybridization. *Int Rev Exp Pathol* (1991), 32:1-56.
- Niedobitek, G., and Herbst, H. In situ detection of Epstein-Barr virus DNA and viral gene products. In: *Epstein Barr virus protocols* (2001), pp. 79-91.
- Niedobitek, G., Fahraeus, R., Herbst, H., Latza, U., Ferszt, A., Klein, G., and Stein, H . The Epstein-Barr virus encoded membrane protein (LMP) induces phenotypic changes in epithelial cells. *Virchows Arch B Cell Pathol* (1992), 62(1):55-9.
- Nikitin, PA., Yan, CM., Forte, E., Bocedi, A., Tourigny, JP., White, RE., Allday, MJ., Patel, A., Dave, SS., Kim, W., Hu, K., Guo, J., Tainter, D., Rusyn, E., and Luftig, MA. An ATM/Chk2-mediated DNA damage-responsive signaling pathway suppresses Epstein-Barr virus transformation of primary human B cells. *Cell Host Microbe* (2010), 16; 8 (6):510-22.
- Nishikawa, J., Yoshiyama, H., Iizasa, H., Kanehiro, Y., Nakamura, M., Nishimura, J., Saito, M., Okamoto, T., Sakai, K., Suehiro, Y., Yamasaki, T., Oga, A., Yanai, H., and Sakaida, I. Epstein-barr virus in gastric carcinoma. *Cancers (Basel)* (2014), 7; 6(4):2259-74.
- Niwa, T., Tsukamoto, T., Toyoda, T., Mori, A., Tanaka, H., Maekita, T., Ichinose, M., Tatematsu, M., and Ushijima, T. Inflammatory processes triggered by Helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res* (2010), 15; 70(4):1430-40.

O

- Oda, K., Tamaru, J., Takenouchi, T., Mikata, A., Nunomura, M., Saitoh, N., Sarashina, H., and Nakajima, N. Association of Epstein-Barr virus with gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Am J Pathol* (1993), 143(4):1063-71.
- Ogembo, JG., Kannan, L., Ghiran, I., Nicholson-Weller, A., Finberg, RW., Tsokos, GC., and Fingerioth, JD. Human complement receptor type 1/CD35 is an Epstein - Barr virus receptor. *Cell Rep* (2013), 21; 3(2):371-85.
- Oh, ST., Seo, JS., Moon, UY., Kang, KH., Shin, DJ., Yoon, SK., Kim, WH., Park, JG., and Lee, SK. A naturally derived gastric cancer cell line shows latency I Epstein-Barr virus

- infection closely resembling EBV-associated gastric cancer. *Virology* (2004), 15; 320(2):330-6.
- Ok, CY., Li, L., and Young, KH. EBV-driven B-cell lymphoproliferative disorders: from biology, classification and differential diagnosis to clinical management. *Exp Mol Med* (2015), 23; 47:e132.
- Oodwin, S., McPherson, JD., and McCombie, WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* (2016), 17; 17(6):333-51.
- Ooka, T. The molecular biology of Epstein-Barr virus. *Biomed Pharmacother* (1985), 39(2):59-66.
- Osawa, T., Chong, JM., Sudo, M., Sakuma, K., Uozaki, H., Shibahara, J., Nagai, H., Funata, N., and Fukayama, M. Reduced expression and promoter methylation of p16 gene in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* (2002), 93(11):1195-200.
- Ott, G., Kirchner, T., and Muller-Hermelink, HK. Monoclonal Epstein-Barr virus genomes but lack of EBV-related protein expression in different types of gastric carcinoma. *Histopathology* (1994), 25 (4):323–9.
- Ott, G., Kirchner, T., Seidl, S., and Muller-Hermelink, HK. Primary gastric lymphoma is rarely associated with Epstein-Barr virus. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* (1993), 64: 287–91.
- Owen, TJ., O'Neil, JD., Dawson, CW., Hu, C., Chen, X., Yao, Y., Wood, VH., Mitchell, LE., White, RJ., Young, LS., and Arrand, JR. Epstein-Barr virus-encoded EBNA1 enhances RNA polymerase III-dependent EBER expression through induction of EBER-associated cellular transcription factors. *Mol Cancer* (2010), 15; 9:241.
- P**
- Pal, AD., Basak, NP., Banerjee, AS., and Banerjee, S. Epstein-Barr virus latent membrane protein-2A alters mitochondrial dynamics promoting cellular migration mediated by Notch signaling pathway. *Carcinogenesis* (2014), 35:1592–1601.
- Pandya, J., and Walling, DM. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) half-life in epithelial cells is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol* (2004), 78(15):8404-10.
- Pandya, J., and Walling, DM. Oncogenic activity of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP-1) is down-regulated by lytic LMP-1. *J Virol* (2006), 80(16):8038-46.
- Park, S., Choi, MG., Kim, KM., Kim, HS., Jung, SH., Lee, JH., Noh, JH., Sohn, TS., Bae, JM., and Kim, S. Lymphoepithelioma-like carcinoma: a distinct type of gastric cancer. *J Surg Res* (2015), 194(2):458-63.
- Parkin, DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* (2006), 15; 118(12):3030-44.
- Pedoeem, A., Azoulay-Alfaguter, I., Strazza, M., Silverman, GJ., and Mor, A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin Immunol* (2014), 153(1):145-52.
- Peek RM, Jr. New Biology to New Treatment of Helicobacter pylori-Induced Gastric Cancer. *Dig Dis* (2016), 34(5):510-6.
- Peng, CW., Xue, Y., Zhao, B., Johannsen, E., Kieff, E., and Harada, S. Direct interactions between Epstein–Barr virus leader protein LP and the EBNA2 acidic domain underlie coordinate transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004), 101:1033–1038.

- Peng, J., Chen, HL., Zhu, XB., Yang, GF., Zhang, ZL., Tian, ZQ., and Pang, DW. Detection of Epstein-Barr virus infection in gastric carcinomas using quantum dot-based fluorescence in-situ hybridization. *J Nanosci Nanotechnol* (2011), 11, 9725-30.
- Peng, R., Moses, SC., Tan, J., Kremmer, E., and Ling, PD. The Epstein-Barr virus EBNA-LP protein preferentially coactivates EBNA2-mediated stimulation of latent membrane proteins expressed from the viral divergent promoter. *J Virol* (2005), 79:4492-4505.
- Petosa, C., Morand, P., Baudin, F., Moulin, M., Artero, JB., and Müller, CW. Structural basis of lytic cycle activation by the Epstein-Barr virus ZEBRA protein. *Mol Cell* (2006), 17; 21(4):565-72.
- Petrovchich, I., and Ford, JM. Genetic predisposition to gastric cancer. *Semin Oncol* (2016), 43(5):554-559.
- Pimienta, G., Fok, V., Haslip, M., Nagy, M., Takyar, S., and Steitz, JA. Proteomics and Transcriptomics of BJAB Cells Expressing the Epstein - Barr virus Noncoding RNAs EBER1 and EBER2. *PLoS One* (2015), 29; 10(6):e0124638.
- Pinkel, D., Straume, T., and Gray, JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986), 83(9):2934-8.
- Pizzo, PA., Magrath, IT., Chattopadhyay, SK., Biggar, RJ., and Gerber, P. A new tumour-derived transforming strain of Epstein-Barr virus. *Nature* (1978), 13; 272(5654):629-31.
- Pokrovskaja, K., Ehlin-Henriksson, B., Kiss, C., Challa, A., Gordon, J., Gogolak, P., Klein, G., and Szekely, L. CD40 ligation downregulates EBNA-2 and LMP-1 expression in EBV-transformed lymphoblastoid cell lines. *Int J Cancer* (2002), 10; 99(5):705-12.
- Polkowski, W., van Sandick, JW., Offerhaus, GJ., ten Kate, FJ., Mulder, J., Obertop, H., and van Lanschot, JJ. Prognostic value of Laurén classification and c-erbB-2 oncogene overexpression in adenocarcinoma of the esophagus and gastroesophageal junction. *Ann Surg Oncol* (1999), 6(3):290-7.
- Portal, D., Rosendorff, A., and Kieff, E. Epstein-Barr nuclear antigen leader protein coactivates transcription through interaction with histone deacetylase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006), 19; 103(51):19278-83.
- Portal, D., Zhao, B., Calderwood, MA., Sommermann, T., Johannsen, E., and Kieff, E. EBV nuclear antigen EBNA1P dismisses transcription repressors NCoR and RBPJ from enhancers and EBNA2 increases NCoR-deficient RBPJ DNA binding. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011), 10; 108(19):7808-13.
- Portal, D., Zhou, H., Zhao, B., Kharchenko, PV., Lowry, E., Wong, L., Quackenbush, J., Holloway, D., Jiang, S., Lu, Y., and Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear antigen leader protein localizes to promoters and enhancers with cell transcription factors and EBNA2. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2013), 12; 110(46):18537-42.
- Portis, T., and Longnecker, R. Epstein-Barr virus (EBV) LMP2A mediates B-lymphocyte survival through constitutive activation of the Ras/PI3K/Akt pathway. *Oncogene* (2004), 11; 23(53):8619-28.
- Powles, T., Eder, JP., Fine, GD., Braith, FS., Loriot, Y., Cruz, C., Bellmunt, J., Burris, HA., Petrylak, DP., Teng, SL., Shen, X., Boyd, Z., Hegde, PS., Chen, DS., and Vogelzang, NJ. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature* (2014), 27; 515(7528):558-62.

Q

- Qiu, J., and Thorley-Lawson, DA. EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014), 29; 111(30):11157-62.
- Qiu, J., Cosmopoulos, K., Pegtel, M., Hopmans, E., Murray, P., Middeldorp, J., Shapiro, M., and Thorley-Lawson, DA. A novel persistence associated EBV miRNA expression profile is disrupted in neoplasia. *PLoS Pathog* (2011), 7(8):e1002193.

R

- Rabson, M., Gradoville, L., Heston, L., and Miller, G. Non-immortalizing P3J-HR-1 Epstein-Barr virus: a deletion mutant of its transforming parent, Jijoye. *J Virol* (1982), 44(3):834-44.
- Ray, A., and Nordén, B. Peptide nucleic acid (PNA): its medical and biotechnical applications and promise for the future. *FASEB J.* (2000);14(9):1041-60.
- Rechsteiner, MP., Bernasconi, M., Berger, C., and Nadal, D. Role of latent membrane protein 2 isoforms in Epstein-Barr virus latency. *Trends Microbiol* (2008), 16(11):520-7.
- Repellin, CE., Tsimbouri, PM., Philbey, AW., and Wilson, JB. Lymphoid hyperplasia and lymphoma in transgenic mice expressing the small non-coding RNA, EBER1 of Epstein-Barr virus. *PLoS ONE* (2010), 8; 5(2):9092.
- Ribeiro, J., Oliveira, C., Malta, M., and Sousa, H. Epstein-Barr virus gene expression and latency pattern in gastric carcinomas: a systematic review. *Future Oncol* (2017), 13(6):567-579.
- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In Fields virol, Knipe DM, Howley PM (eds). Walters Kluwer/Lippincott: Philadelphia, USA, 2007; 2655-2700
- Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr virus. In Fields virol, Knipe DM, Howley PM (eds). Walters Kluwer/Lippincott: Philadelphia, USA, 2007; 2655-2700
- Rickinson, AB., and Kieff, E. Fields Virology. 4th edn. Knipe DM and Howley PM (eds). Lippincott Williams & Wilkins Publishers: Philadelphia (2001), pp. 2575-2627.
- Rickinson, AB., and Kieff, E. In: Fields Virology. Fields BN, Knipe DM and Howley PM. (eds). Lippincott-Raven Publishers: Philadelphia (1996), pp. 2397-2446.
- Rickinson, AB., Young, LS., and Rowe, M. Influence of the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA 2 on the growth phenotype of virus-transformed B cells. *J Virol* (1987), 61(5):1310-7.
- Rochford, R., and Mosier, DE. Differential Epstein-Barr virus gene expression in B-cell subsets recovered from lymphomas in SCID mice after transplantation of human peripheral blood lymphocytes. *J Virol* (1995), 69(1):150-5.
- Röcken, C. Gastric tumors and tumor precursors. *Pathologe* (2017), 38(2):75-86.
- Roizman, B., and Whitley, RJ. The nine ages of herpes simplex virus. *Herpes* (2001), 8(1):23-7.
- Rosales-Pérez, S, Cano-Valdez, AM, Flores-Balcázar, CH, Guedea-Edo, F, Lino-Silva, LS, Lozano-Borbalas, A, Navarro-Martín, A, and Poitevin-Chacón, A. Expression of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP-1), p16 and p53 proteins in

- nonendemic nasopharyngeal carcinoma (NPC): a clinicopathological study. *Arch Med Res.* (2014);45(3):229-36
- Rovedo, M., and Longnecker, R. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A preferentially signals through the Src family kinase Lyn. *J Virol* (2008), 82(17):8520-8.
- Rowe, M., Lear, AL., Croom-Carter, D., Davies, AH., and Rickinson, AB. Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* (1992), 66:122-31.
- Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, DS., Hardy, R., Croom-438 Carter, D., Lundgren, E., and Rickinson, AB. Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell-specific response that is delayed relative to NF-kappa B activation and to induction of cell surface markers. *J Virol* (1994), 68, 5602-12.
- Rowe, M., Young, LS., Cadwallader, K., Petti, L., Kieff, E., and Rickinson, AB. Distinction between Epstein-Barr virus type A (EBNA 2A) and type B (EBNA 2B) isolates extends to the EBNA 3 family of nuclear proteins. *J Virol* (1989), 63(3):1031-9.
- Ryan, JL., Jones, RJ., Kenney, SC., Rivenbark, AG., Tang, W., Knight, ER., Coleman, WB., and Gulley, ML. Epstein-Barr virus-specific methylation of human genes in gastric cancer cells. *Infect Agent Cancer* (2010), 31; 5:27.
- Ryan, JL., Morgan, DR., Dominguez, RL., Thorne, LB., Elmore, SH., Mino-Kenudson, M., Lauwers, GY., Booker, JK., and Gulley, ML. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma. *Lab Invest* (2009), 89(1):80-90.

S

- Sadler, RH., and Raab-Traub, N. Structural analyses of the Epstein-Barr virus BamHI A transcripts. *J Virol* (1995), 69(2):1132-41.
- Sáez, A., Andreu, FJ., Seguí, MA., Baré, ML., Fernández, S., Dinarés, C., and Rey, M. HER-2gen amplification by chromogenic in situ hybridisation (CISH) compared with fluorescence in situ hybridisation (FISH) in breast cancer-A study of two hundredcases. *Breast* (2006), 15(4):519-27.
- Saha, A., and Robertson, ES. Impact of EBV essential nuclear protein EBNA-3C on B-cell proliferation and apoptosis. *Future Microbiol.* 2013 Mar;8(3):323-52.
- Salek-Ardakani, S., Arrand, JR. and Mackett, M. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology* (2002), 20; 304(2): 342-51.
- Sall, A., Caserta, S., Jolicoeur, P., Franqueville, L., de Turenne-Tessier, M., and Ooka, T. Mitogenic activity of Epstein-Barr virus-encoded BARF1 protein. *Oncogene* (2004), 17; 23(28):4938-44.
- Samanta, M., Iwakiri, D., Kanda, T., Imaizumi, T., and Takada, K. EB virus-encoded RNAs are recognized by RIG-I and activate signaling to induce type I IFN. *EMBO J* (2006), 20; 25(18):4207-14.
- Sample, J., Lancz, G., and Nonoyama, M. Mapping of genes in BamHI fragment M of Epstein-Barr virus DNA that may determine the fate of viral infection. *J Virol* (1986), 57(1):145-54.

- Sample, J., Young, L., Martin, B., Chatman, T., Kieff, E., Rickinson, A., and Kieff, E. Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J Virol* (1990), 64(9):4084-92.
- Samuels, Y., and Velculescu, VE. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Cell Cycle* (2004), 3(10):1221-4.
- Samuels, Y., and Waldman, T. Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers. *Curr Top Microbiol Immunol* (2010); 347:21-41.
- Sarda, S., and Hannenhalli, S. Next-generation sequencing and epigenomics research: a hammer in search of nails. *Genomics Inform* (2014), 12(1):2-11.
- Sathiyamoorthy, K., Hu, YX., Möhl, BS., Chen, J., Longnecker, R., and Jardetzky, TS. Structural basis for Epstein-Barr virus host cell tropism mediated by gp42 and gHgL entry glycoproteins. *Nat Commun* (2016), 8;7:13557.
- Schistosomes, liver flukes., and Helicobacter, pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* (1994), 61:1-241.
- Scholle, F., Bendt, KM., and Raab-Traub, N. Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J Virol* (2000), 74(22):10681-9.
- Scholle, F., Longnecker, R., and Raab-Traub, N. Epithelial cell adhesion to extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2: a role for C-terminal Src kinase. *J Virol* (1999), 73(6):4767-75.
- Schwemmle, M., Clemens, MJ., Hilse, K., Pfeifer, K., Tröster, H., Müller, WE., and Bachmann, M. Localization of Epstein-Barr virus-encoded RNAs EBER-1 and EBER-2 in interphase and mitotic Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1992), 1; 89 (21):10292-6.
- Schwingshackl, L., and Hoffmann, G. Does a Mediterranean-Type Diet Reduce Cancer Risk? *Curr Nutr Rep* (2016), 5:9-17.
- Selves, J., Bibeau, F., Brousset, P., Meggetto, F., Mazerolles, C., Voigt, JJ., Pradere, B., Chiotasso, P., and Delsol, G. Epstein-Barr virus latent and replicative gene expression in gastric carcinoma. *Histopathology* (1996), 28(2):121-7.
- Seto, E., Ooka, T., Middeldorp, JM., and Takada, K. Reconstitution of nasopharyngeal carcinoma-type EBV infection induces tumorigenicity. *Cancer Res* (2008), 68:1030-1036.
- Seto, E., Yang, L., and Middeldorp, J. Epstein-Barr virus (EBV)-encoded BARF 1 gene is expressed in nasopharyngeal carcinoma and EBV-associated gastric carcinoma tissues in the absence of lytic gene expression. *J Med Virol* (2005), 76: 82-8.
- Sezeur, A., Schielke, A., Larue, L., and Fléjou, JF. Cancer gastrique héréditaire diffus. *Gastro Clin Biol* (2006), 30;10 : 1205-1213.
- Shair, KH., Schnegg, CI., and Raab-Traub, N. EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res* (2008); 68: 6997-7005
- Shair, KH., Schnegg, CI., and Raab-Traub, N. EBV latent membrane protein 1 effects on plakoglobin, cell growth, and migration. *Cancer Res* (2008); 68: 6997-7005
- Shannon-Lowe, C., and Rowe, M. Epstein-Barr virus infection of polarized epithelial cells via the basolateral surface by memory B cell-mediated transfer infection. *PLoS Pathog* (2011), 7(5):e1001338.

- Shannon-Lowe, CD., Neuhierl, B., Baldwin, G., Rickinson, AB., and Delecluse, HJ. Resting B cells as a transfer vehicle for Epstein-Barr virus infection of epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006), 2; 103(18):7065-70.
- Sharp, TV., Schwemmle, M., Jeffrey, I., Laing, K., Mellor, H., Proud, CG., Hilse, K., and Clemens, MJ. Comparative analysis of the regulation of the interferon-inducible protein kinase PKR by Epstein-Barr virus RNAs EBER-1 and EBER-2 and adenovirus VAI RNA. *Nucleic Acids Res* (1993), 25; 21(19):4483-90.
- Shibata, D., and Weiss, LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* (1992), 140, 769-74.
- Shim, AH., Chang, RA., Chen, X., Longnecker, R., and He, X. Multipronged attenuation of macrophage-colony stimulating factor signaling by Epstein- Barr virus BARF1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2012), 109:12962–12967.
- Shimizu, N., Yoshiyama, H., and Takada, K. Clonal propagation of Epstein-Barr virus (EBV) recombinants in EBV-negative Akata cells. *J Virol* (1996), 70(10):7260-3.
- Shimizu, T., Marusawa, H., Matsumoto, Y., Inuzuka, T., Ikeda, A., Fujii, Y., Minamiguchi, S., Miyamoto, S., Kou, T., Sakai, Y., Crabtree, JE., and Chiba, T. Accumulation of somatic mutations in TP53 in gastric epithelium with *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology* (2014), 147(2):407-17.e3.
- Shin, JY., Kim, J., Choi, KS., Suh, M., Park, B., and Jun, JK. Relationship between Salt Preference and Gastric Cancer Screening: An Analysis of a Nationwide Survey in Korea. *Cancer Res Treat* (2016), 48(3):1037-44.
- Shin, JY., Kim, JO., Lee, SK., Chae, HS., and Kang, JH. LY294002 may overcome 5-FU resistance via down-regulation of activated p-AKT in Epstein-Barr virus-positive gastric cancer cells. *BMC Cancer* (2010), 13; 10:425.
- Shin, WS., Kang, MW., Kang, JH., Choi, MK., Ahn, BM., Kim, JK., Sun, HS., and Min, KW. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinomas among Koreans. *Am J Clin Pathol.* (1996);105(2):174-81.
- Shinkura, R., Yamamoto, N., Koriyama, C., Shinmura, Y., Eizuru, Y., and Tokunaga, M. Epstein-Barr virus-specific antibodies in Epstein-Barr virus-positive and -negative gastric carcinoma cases in Japan. *J Med Virol* (2000), 60: 411–16.
- Shinozaki, A., Sakatani, T., Ushiku, T., Hino, R., Isogai, M., Ishikawa, S., Uozaki, H., Takada, K., Fukayama, M. Downregulation of microRNA-200 in EBV-associated gastric carcinoma. *Cancer Res* (2010), 70:4719–4727.
- Shinozaki-Ushiku, A., Kunita, A., and Fukayama, M. Update on Epstein-Barr virus and gastric cancer (review). *Int J Oncol* (2015)(a), 46(4):1421-34.
- Shinozaki-Ushiku, A., Kunita, A., Isogai, M., Hibiya, T., Ushiku, T., Takada, K., and Fukayama, M. Profiling of Virus-Encoded MicroRNAs in Epstein-Barr Virus-Associated Gastric Carcinoma and Their Roles in Gastric Carcinogenesis. *J Virol* (2015), (b); 89(10):5581-91.
- Shope, T., Dechairo, D., and Miller, G. Malignant lymphoma in cottontop marmosets after inoculation with Epstein-Barr virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1973), 70(9):2487-91.
- Shousha, S., and Luqmani, YA. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma and adjacent normal gastric and duodenal mucosa. *J Clin Pathol* (1994), 47:695–698.

- Sinclair, AJ., Palmero, I., Peters, G., and Farrell, PJ. EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *EMBO J* (1994), 15; 13(14):3321-8.
- Sivachandran, N., Dawson, CW., Young, LS., Liu, FF., Middeldorp, J., and Frappier, L. Contributions of the Epstein-Barr virus EBNA1 protein to gastric carcinoma. *J Virol* (2012), 86:60–68.
- Sivachandran, N., Sarkari, F., and Frappier, L. Epstein–Barr nuclear antigen 1 contributes to nasopharyngeal carcinoma through disruption of PML nuclear bodies. *PLoS Pathog* (2008), 4:e1000170.
- Sixbey, JW., and Pagano, JS. Epstein-Barr virus transformation of human B lymphocytes despite inhibition of viral polymerase. *J Virol* (1985), 53(1):299-301.
- Sjoblom, A., Yang, W., Palmqvist, L., Jansson, A., and Rymo, L. An ATF/CRE element mediates both EBNA2-dependent and EBNA2-independent activation of the Epstein-Barr virus LMP1 gene promoter. *J. Virol* (1998), 72:1365-1376.
- Sjödahl, K., Lu, Y., Nilsen, TI., Ye, W., Hveem, K., Vatten, L., and Lagergren, J. Smoking and alcohol drinking in relation to risk of gastric cancer: a population-based, prospective cohort study. *Int J Cancer* (2007), 1; 120(1):128-32.
- Skalska, L., White, RE., Franz, M., Ruhmann, M., and Allday, MJ. Epigenetic repression of p16(INK4A) by latent Epstein-Barr virus requires the interaction of EBNA3A and EBNA3C with CtBP. *PLoS Pathog* (2010), 10;6(6):e1000951.
- Slamon, DJ., Clark, GM., Wong, SG., Levin, WJ., Ullrich, A., and McGuire, WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* (1987), 235(4785):177-82.
- Smith, PR., de Jesus, O., Turner, D., Hollyoake, M., Karstegl, CE., Griffin, BE., Karran, L., Wang, Y., Hayward, SD., and Farrell, PJ. Structure and coding content of CST (BART family RNAs of Epstein-Barr virus. *J Virol* (2000), 74(7):3082-92.
- Smith, PR., Gao, Y., Karran, L., Jones, MD., Snudden, D., and Griffin, BE. Complex nature of the major viral polyadenylated transcripts in Epstein-Barr virus-associated tumors. *J Virol* (1993), 67(6):3217-25.
- Song, HJ., Srivastava, A., Lee, J., Kim, YS., Kim, KM., Ki Kang, W., Kim, M., Kim, S., Park, CK., and Kim, S. Host inflammatory response predicts survival of patients with Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma. *Gastroenterology* (2010), 139(1):84-92.e2.
- Song, KA., Yang, SD., Hwang, J., Kim, JI., and Kang, MS. The full-length DNA sequence of Epstein Barr virus from a human gastric carcinoma cell line, SNU-719. *Virus Genes* (2015), 51(3):329-37.
- Speck, O., Tang, W., Morgan, DR., Kuan, PF., Meyers, MO., Dominguez, RL., Martinez, E., and Gulley, ML. Three Molecular Subtypes of Gastric Adenocarcinoma Have Distinct Histochemical Features Reflecting Epstein-Barr Virus Infection Status and Neuroendocrine Differentiation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* (2015), 23(9):633-45.
- Spender, LC., Cornish, GH., Sullivan, A., and Farrell, PJ. Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF (alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and

- correlates with the B-cell activation phenotype. *Journal of Virology* (2002), 76:4919–4927.
- Stowe, RP., Cubbage, ML., Sams, CF., Pierson, DL., Barrett, AD. Detection and quantification of Epstein-Barr virus EBER1 in EBV-infected cells by fluorescent in situ hybridization and flow cytometry. *J Virol Methods*. (1998),75(1):83-91.
- Strong, MJ., Xu, G., Coco, J., Baribault, C., Vinay, DS., Lacey, MR., Strong, AL., Lehman, TA., Seddon, MB., Lin, Z., Concha, M., Baddoo, M., Ferris, M., Swan, KF., Sullivan, DE., Burow, ME., Taylor, CM., and Flemington, EK. Differences in gastric carcinoma microenvironment stratify according to EBV infection intensity: implications for possible immune adjuvant therapy. *PLoS Pathog* (2013), 9(5):e1003341.
- Sugden, B., and Warren, N. A promoter of Epstein–Barr virus that can function during latent infection can be transactivated by EBNA-1, a viral protein required for viral DNA replication during latent infection. *J Virol* (1989), 63:2644–2649.
- Sun, L., Zhao, Y., Shi, H., Ma, C., and Wei, L. LMP-1 induces survivin expression to 451 inhibit cell apoptosis through the NF- κ B and PI3K/Akt signaling pathways in nasal 452 NK/T-cell lymphoma. *Oncol Rep* (2015), 33, 2253-60.
- Sunakawa, Y., and Lenz, HJ. Molecular classification of gastric adenocarcinoma: translating new insights from the cancer genome atlas research network. *Curr Treat Options Oncol* (2015), 16(4):17.
- ## T
- Tajima, M., Komura, M., and Okinaga, K. Establishment of Epstein-Barr virus-positive human gastric epithelial cell lines. *Jpn J Cancer Res* (1998), 89:262–8.
- Takada, K. Cross-linking of cell surface immunoglobulins induces Epstein-Barr virus in Burkitt lymphoma lines. *Int J Cancer* (1984), 15; 33(1):27-32.
- Takada, K., and Nanbo, A. The role of EBERs in oncogenesis. *Semin Cancer Biol* (2001), 11:461–467.
- Takasaka, N., Tajima, M., Okinaga, K., Satoh, Y., Hoshikawa, Y., Katsumoto, T., Kurata, T., and Sairenji, T. Productive infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-genome-positive epithelial cell lines (GT38 and GT39) derived from gastric tissues. *Virology* (1998), 247:152–9.
- Tang, W., Morgan, DR., Meyers, MO., Dominguez, RL., Martinez, E., Kakudo, K., Kuan, PF., Banet, N., Muallem, H., Woodward, K., Speck, O., and Gulley, ML. Epstein-barr virus infected gastric adenocarcinoma expresses latent and lytic viral transcripts and has a distinct human gene expression profile. *Infect Agent Cancer* (2012), 28; 7(1):21.
- Tanner, M., Hollmén, M., Junttila, TT., Kapanen, AI., Tammola, S., Soini, Y., Helin, H., Salo, J., Joensuu, H., Sihvo, E., Elenius, K., Isola, J. Amplification of HER-2 in gastric carcinoma: association with Topoisomerase IIalpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* (2005), 16(2):273-8.
- Tattevin, P., Crémieux, AC., Descamps, D., and Carbon, C. Transfusion-related infectious mononucleosis. *Scand J Infect Dis* (2002), 34(10):777-8.
- Tempera, I., and Lieberman, PM. Epigenetic regulation of EBV persistence and oncogenesis. *Semin Cancer Biol* (2014), 26:22-9.

- Temple, RM., Zhu, J., Budgeon, L., Christensen, ND., Meyers, C., Sample,., and CE. Efficient replication of Epstein-Barr virus in stratified epithelium in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2014) 18;111(46):16544-9.
- Teramoto, N, Maeda, A, Kobayashi, K, Hayashi, K, Oka, T, Takahashi, K, Takada, K, Klein, G, and Akagi T. Epstein-Barr virus infection to Epstein-Barr virus-negative nasopharyngeal carcinoma cell line TW03 enhances its tumorigenicity. *Lab Invest*. (2000);80(3):303-12
- The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma. *Nature* (2014), 513:202–209.
- Thiel, J., Kimmig, L., Salzer, U., Grudzien, M., Lebrecht, D., Hagena, T., Draeger, R., Voelxen, N., Bergbreiter, A., Jennings, S., Gutenberger, S., Aichem, A., Illges, H., Hannan, JP., Kienzler, AK., Rizzi, M., Eibel, H., Peter, HH., Warnatz, K., Grimbacher, B., Rump, JA., and Schlesier, M. Genetic CD21 deficiency is associated with hypogammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* (2012), 129(3):801-810.
- Thompson, MP., and Kurzrock, R. Epstein-Barr virus and cancer. *Clin Cancer Res* (2004), 10(1): 803-21.
- Thorley-Lawson EBV. Persistence and latent infection in vivo. In: Robertson ES, ed. Epstein - Barr virus. Norfolk: Caister Academic Press, 2005: 309–58 tonsillitis. *Arkh Patol* (2012), 74(2):19-22
- Thorley-Lawson, DA. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* (2005), 116(2):251-61.
- Thorley-Lawson, DA., and Gross, A. Persistence of the Epstein-Barr virus and the origins of associated lymphomas. *N Engl J Med* (2004), 350:1328–37.
- Thorley-Lawson, DA., Hawkins, JB., Tracy, SI, and Shapiro, M. The pathogenesis of Epstein–Barr virus persistent infection. *Curr Opin Virol* (2013), 3(3): 227–232.
- Tiberi, L., Bonnefont, J., van den Ameele, J., Le Bon, SD., Herpoel, A., Bilheu, A., Baron, BW., and Vanderhaeghen, P. A BCL6/BCOR/SIRT1 complex triggers neurogenesis and suppresses medulloblastoma by repressing Sonic Hedgehog signaling. *Cancer Cell* (2014), 8; 26(6):797-812.
- Tokunaga, M., Land, CE., Uemura, Y., Tokudome, T., Tanaka, S., and Sato, E. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* (1993), 143(5):1250-4.
- Tomkinson, B., and Kieff, E. Use of second-site homologous recombination to demonstrate that Epstein-Barr virus nuclear protein 3B is not important for lymphocyte infection or growth transformation in vitro. *J Virol* (1992), 66(5):2893-903.
- Tomkinson, B., Robertson, E., and Kieff, E. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* (1993), 67(4):2014-25.
- Topalian, SL., Hodi, FS., Brahmer, JR., Gettinger, SN., Smith, DC., McDermott, DF., Powderly, JD., Carvajal, RD., Sosman, JA., Atkins, MB., Leming, PD., Spigel, DR., Antonia, SJ., Horn, L., Drake, CG., Pardoll, DM., Chen, L., Sharfman, WH., Anders, RA., Taube, JM., McMiller, TL., Xu, H., Korman, AJ., Jure-Kunkel, M., Agrawal, S., McDonald, D., Kollia, GD., Gupta, A., Wigginton, JM., and Sznol, M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* (2012), 28; 366(26):2443-54.

- Torre, LA., Bray, F., Siegel, RL., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., Jemal, A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* (2015), 65(2):87-108.
- Torre, LA., Siegel, RL., Ward, EM., and Jemal, A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2016), 25(1):16-27.
- Touati, E., Michel, V., Thiberge, JM., Wuscher, N., Huerre, M., and Labigne, A. Chronic *Helicobacter pylori* infections induce gastric mutations in mice. *Gastroenterology* (2003), 124(5):1408-19.
- Truong, CD., Feng, W., Li, W., Khoury, T., Li, Q., Alrawi, S., Yu, Y., Xie, K., Yao, J., and Tan, D. Characteristics of Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a study of 235 cases at a comprehensive cancer center in U.S.A. *J Exp Clin Cancer Res* (2009), 3; 28-14.
- Tsai, CL., Li, HP., Lu, YJ., Hsueh, C., Liang, Y., Chen, CL., Tsao, SW., Tse, KP., Yu, JS., and Chang, YS. Activation of DNA methyltransferase 1 by EBV LMP1 Involves c-Jun NH (2)-terminal kinase signaling. *Cancer Res* (2006), 15; 66(24):11668-76.
- Tsai, CN., Tsai, CL., Tse, KP., Chang, HY., and Chang, YS. The Epstein-Barr virus oncogene product, latent membrane protein 1, induces the downregulation of E-cadherin gene expression via activation of DNA methyltransferases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2002) 23; 99(15):10084-9
- Tsang, CM., Zhang, G., Seto, E., Takada, K., Deng, W., Yip, YL., Man, C., Hau, PM., Chen, H., Cao, Y., Lo, KW., Middeldorp, JM., Cheung, AL., and Tsao, SW. Epstein-Barr virus infection in immortalized nasopharyngeal epithelial cells: regulation of infection and phenotypic characterization. *Int J Cancer* (2010), 127:1570-1583.
- Tsao, SW., Tramoutanis, G., Dawson, CW., Lo, AK., and Huang, DP. The significance of LMP1 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* (2002), 12(6):473-87.
- Tsao, SW., Tsang, CM., Pang, PS., Pang, PS., Zhang, G., Chen, H., and Lo, KW. The biology of EBV infection in human epithelial cells. *Semin Cancer Biol* (2012), 22:137-143.
- Tsao, SW., Tsang, CM., To, KF., and Lo, KW. The role of Epstein-Barr virus in epithelial malignancies. *J Pathol* (2015), 235(2):323-33.
- Tu, C., Yuan, L., and Zhou, J. Comments on a meta-analysis and systematic review of the clinicopathological significance of CDH1 in gastric cancer. *Drug Des Devel Ther* (2016), 15; 10:1159-60.
- Tugizov, S., Herrera, R., Veluppillai, P., Greenspan, J., Greenspan, D., and Palefsky, JM. Epstein-Barr virus (EBV)-infected monocytes facilitate dissemination of EBV within the oral mucosal epithelium. *J Virol* (2007), 81(11):5484-96.
- Tugizov, SM., Berline, JW., and Palefsky, JM. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nature medicine* (2003), 9(3): 307-14.
- Turenne-Tessier, M., Jolicoeur, P., Middeldorp, JM., and Ooka, T. Expression and analysis of the Epstein-Barr virus BARF1-encoded protein from a tetracycline-regulatable adenovirus system. *Virus Res* (2005), 109(1):9-18.
- Tzellos, S., and Farrell, PJ. Epstein - Barr virus sequence variation-biology and disease. *Pathogens* (2012), 8; 1(2):156-74.

U

- Uemura, Y., Tokunaga, M., Arikawa, J., Yamamoto, N., Hamasaki, Y., Tanaka, S., Sato, E., and Land, CE. A unique morphology of Epstein-Barr virus-related early gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (1994), 3(7):607-11.
- Uozaki, H., and Fukayama, M. Epstein-Barr virus and gastric carcinoma—viral carcinogenesis through epigenetic mechanisms. *Int J Clin Exp Pathol* (2008),1; 1(3):198-216.

V

- Van Beek, J., zur Hausen, A., Klein Kranenbarg, E., van de Velde, CJ., Middeldorp, JM., van den Brule, AJ., Meijer, CJ., and Bloemena, E. EBV-positive gastric adenocarcinomas: a distinct clinicopathologic entity with a low frequency of lymph node involvement. *J Clin Oncol* (2004), 5; 22(4):664-70.
- van der Ploeg, AH., Kumpf, O., Seelow, E., Almanza, LC., Schlag, PM., Schumann, RR., and Hamann, L. The course of gastric cancer following surgery is associated with genetic variations of the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 β . *Gastric Cancer* (2015), 18(1):77-83.
- Vereide, DT., Seto, E., Chiu, YF., Hayes, M., Tagawa, T., Grundhoff, A., Hammerschmidt, W., and Sugden, B. Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miRNAs. *Oncogene* (2014), 6; 33(10):1258-64.
- Vockerodt, M., Pinkert, D., Smola-Hess, S., Michels, A., Ransohoff, RM., Tesch, H., and Kube, D. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer* (2005)20; 114(4):598-605
- Vockerodt, M., Pinkert, D., Smola-Hess, S., Michels, A., Ransohoff, RM., Tesch, H., and Kube, D. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 induces expression of the chemokine IP-10: importance of mRNA half-life regulation. *Int J Cancer* (2005)20; 114(4):598-605

W

- Wakisaka, N., Kondo, S., Yoshizaki, T., Muro, S., Furukawa, M., and Pagano, JS. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol* (2004), 24(12):5223-34.
- Walling, DM., Ray, AJ., Nichols, JE., Flaitz, CM., and Nichols, CM. Epstein-Barr virus infection of Langerhans cell precursors as a mechanism of oral epithelial entry, persistence, and reactivation. *J Virol* (2007), 81(13):7249-68.
- Waltzer, L., Logeat, F., Brou, C., Israel, A., Sergeant, A., and Manet, E. The human J kappa recombination signal sequence binding protein (RBP-J kappa) targets the Epstein-Barr virus EBNA2 protein to its DNA responsive elements. *EMBO J* (1994), 1; 13(23):5633-8.
- Waltzer, L., Perricaudet, M., Sergeant, A., and Manet, E. Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* (1996), 70(9):5909-15.
- Wan, J., Sun, L., Mendoza, JW., Chui, YL., Huang, DP., Chen, ZJ., Suzuki, N., Suzuki, S., Yeh, WC., Akira, S., Matsumoto, K., Liu, ZG., and Wu, Z. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol* (2004), 24(1):192-9.

- Wang, A., Zhang, W., Jin, M., Zhang, J., Li, S., Tong, F., and Zhou, Y. Differential expression of EBV proteins LMP1 and BHFR1 in EBV associated gastric and nasopharyngeal cancer tissues. *Mol Med Rep.* (2016)(b);13(5):4151-8.
- Wang, C., Deng, X., Li, X., Gu, H., Yi, W., Weng, X., Xia, L., and Cao, Y. [Matrix metalloproteinase 9 expression is induced by Epstein-Barr virus LMP1 via NF-kappa B or AP-1 signaling pathway in nasopharyngeal carcinoma cells]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* (2002);24 (1):9-13
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. An Epstein-Barr virus membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell* (1985), 43: 831-40.
- Wang, D., Liebowitz, D., and Kieff, E. The truncated form of the Epstein-Barr virus latent-infection membrane protein expressed in virus replication does not transform rodent fibroblasts. *J Virol* (1988), 62(7):2337-46.
- Wang, HH., Wu, MS., Shun, CT., Wang, HP., Lin, CC., and Lin, JT. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: a subset of gastric carcinoma with distinct clinicopathological features and high prevalence of Epstein-Barr virus infection. *Hepatogastroenterology* (1999), 46(26):1214-9.
- Wang, K., Yuen, ST., Xu, J., Lee, SP., Yan, HH., Shi, ST., Siu, HC., Deng, S., Chu, KM., Law, S., Chan, KH., Chan, AS., Tsui, WY., Ho, SL., Chan, AK., Man, JL., Foglizzo, V., Ng, MK., Chan, AS., Ching, YP., Cheng, GH., Xie, T., Fernandez, J., Li, VS., Clevers, H., Rejto, PA., Mao, M., and Leung, SY. Whole-genome sequencing and comprehensive molecular profiling identify new driver mutations in gastric cancer. *Nat Genet* (2014), 46(6):573-82.
- Wang, P., Zhang, Q., Yang, JF., Cheng, ZN., Zhang, K., and Yu, DH. [Epstein-Barr virus infection and p16 (INK4a) overexpression in gastric adenocarcinoma]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* (2008), 22(4):244-6.
- Wang, Q., Tsao, SW., Ooka, T., Nicholls, JM., Cheung, HW., Fu, S., Wong, YC., and Wang, X. Anti-apoptotic role of BARM1 in gastric cancer cells. *Cancer Lett* (2006), 8; 238(1):90-103.
- Wang, T., Cai, H., Sasazuki, S., Tsugane, S., Zheng, W., Cho, ER., Jee, SH., Michel, A., Pawlita, M., Xiang, YB., Gao, YT., Shu, XO., You, WC., and Epplein, M. Fruit and vegetable consumption, Helicobacter pylori antibodies, and gastric cancer risk: A pooled analysis of prospective studies in China, Japan, and Korea. *Int J Cancer* (2017), 1; 140(3):591-599.
- Wang, TC., Dangler, CA., Chen, D., Goldenring, JR., Koh, T., Raychowdhury, R., Coffey, RJ., Ito, S., Varro, A., Dockray, GJ., and Fox, JG. Synergistic interaction between hypergastrinemia and Helicobacter infection in a mouse model of gastric cancer. *Gastroenterology* (2000), 118(1):36-47.
- Wang, Y., Luo, B., Zhao, P., and Huang, BH. [Expression of Epstein-Barr virus genes in EBV-associated gastric carcinoma]. *Ai Zheng* (2004), 23(7):782-7.
- Wang, ZH., Zhao, JJ., and Yuan, Z. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma: A case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* (2016)(a), 14; 22(10):3056-61.
- Wasil, LR., and Shair, KH. Epstein-Barr virus LMP1 induces focal adhesions and epithelial cell migration through effects on integrin- $\alpha 5$ and N-cadherin. *Oncogenesis.* (2015) 19;4:e171

- Wasil, LR., and Shair, KH. Epstein-Barr virus LMP1 induces focal adhesions and epithelial cell migration through effects on integrin- $\alpha 5$ and N-cadherin. *Oncogenesis*. (2015) 19;4:e171
- Wei, MX., and Ooka, T. A transforming function of the BARF1 gene encoded by Epstein-Barr virus. *EMBO J* (1989), 8(10):2897-903.
- Weiss, LM., Chen, YY., Liu, XF., and Shibata, D. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol* (1991), 139(6):1259- 65.
- White, RE., Groves, IJ., Turro, E., Yee, J., Kremmer, E., and Allday, MJ. Extensive co-operation between the Epstein-Barr virus EBNA3 proteins in the manipulation of host gene expression and epigenetic chromatin modification. *PLoS One* (2010), 15; 5(11):e13979.
- White, RE., Rämer, PC., Naresh, KN., Meixlsperger, S., Pinaud, L., Rooney, C., Savoldo, B., Coutinho, R., Bödör, C., Gribben, J., Ibrahim, HA., Bower, M., Nourse, JP., Gandhi, MK., Middeldorp, J., Cader, FZ., Murray, P., Münz, C., and Allday, MJ. EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and is found in human tumors. *J Clin Invest* (2012), 122(4):1487-502.
- Wiech, T., Nikolopoulos, E., Lassman, S., Heidt, T., Schöpflin, A., Sarbia, M., Werner, M., Shimizu, Y., Sakka, E., Ooka, T., and zur Hausen, A. Cyclin D1 expression is induced by viral BARF1 and is overexpressed in EBV-associated gastric cancer. *Virchows Arch* (2008), 452(6):621-7.
- Wilson, BG., and Roberts, CW. SWI/SNF nucleosome remodellers and cancer. *Nat Rev Cancer* (2011), 9; 11(7):481-92.
- Wiseman, M. The second World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research expert report. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. *Proc Nutr Soc* (2008), 67(3):253-6.
- Wong, HL., Wang, X., Chang, RC., Jin, DY., Feng, H., Wang, Q., Lo, KW., Huang, DP., Yuen, PW., Takada, K., Wong, YC., and Tsao, SW. Stable expression of EBERs in immortalized nasopharyngeal epithelial cells confers resistance to apoptotic stress. *Mol Carcinog* (2005), 44(2):92-101.
- Woo, HD., Park, S., Oh, K., Kim, HJ., Shin, HR., Moon, HK., and Kim, J. Diet and cancer risk in the Korean population: a meta- analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* (2014), 15(19):8509-19.
- Wood, CD., Veenstra, H., Khasnis, S., Gunnell, A., Webb, HM., Shannon-Lowe, C., Andrews, S., Osborne, CS., and West, MJ. MYC activation and BCL2L1 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs. *Elife* (2016), 4; 5. pii: e18270.
- Wood, VH., O'Neil, JD., Wei, W., Stewart, SE., Dawson, CW., and Young, LS . Epstein-Barr virus encoded EBNA1 regulates cellular gene transcription and modulates the STAT1 and TGF β signaling pathways. *Oncogene* (2007), 14 ; 26(28):4135-47.
- World Cancer Research Fund, American Institute for Cancer Research Food, Nutrition and the Prevention of Cancer: a Global Perspective. Vol. 67. Washington DC: American Institute for Cancer Research; (1997).

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research: Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: A Global Perspective. Washington DC: American Institute for Cancer Research; (2007).

Wu, DY., Kalpana, GV., Goff, SP., and Schubach, WH. Epstein-Barr virus nuclear protein 2 binds to a component of the human SNF-SWI complex, hSNF5/Ini1. *J. Virol* (1996), 70:6020-6028.

Wu, L., and Hutt-Fletcher, LM. Point mutations in EBV gH that abrogate or differentially affect B cell and epithelial cell fusion. *Virology* (2007), 20; 363(1):148-55.

Wu, MS., Shun, CT., Wu, CC., Hsu, TY., Lin, MT., Chang, MC., Wang, HP., and Lin, JT. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas: relation to H. pylori infection and genetic alterations. *Gastroenterology* (2000), 118(6):1031-8.

X

Xiao, J., Palefsky, JM., Herrera, R., and Tugizov, SM. Characterization of the Epstein-Barr virus glycoprotein BMRF-2. *Virology* (2007), 15; 359(2):382-96.

Xiao, J., Palefsky, JM., Herrera, R., Berline, J., and Tugizov, SM. The Epstein-Barr virus BMRF-2 protein facilitates virus attachment to oral epithelial cells. *Virology* (2008), 20; 370(2):430-42.

Xing, Y., Song, HM., Wu, XY., Wang, W., and Wei, M. [Significance of detecting the EBV-DNA level in peripheral blood mononuclear cells and the EBV-infected cell type in patients with chronic active EBV infection]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* (2011);49(7):495-500.

Xu, L., Qu, YH., Chu, XD., Wang, R., Nelson, HH., Gao, YT., and Yuan, JM. Urinary levels of N-nitroso compounds in relation to risk of gastric cancer: findings from the shanghai cohort study. *PLoS One* (2015), 6; 10(2):e0117326.

Xu, Q., DU, J., and Liu, B. Lymphoepithelioma-like gastric carcinoma located in the lesser curvature of the gastric body: A case report and review of the literature. *Mol Clin Oncol* (2016), 4(3):405-408.

Xu, Y., Shi, Y., Yuan, Q., Liu, X., Yan, B., Chen, L., Tao, Y., and Cao, Y. Epstein-Barr Virus encoded LMP1 regulates cyclin D1 promoter activity by nuclear EGFR and STAT3 in CNE1 cells. *J Exp Clin Cancer Res.* (2013) 13;32:90.

Y

Yakirevich, E., and Resnick, MB. Pathology of gastric cancer and its precursor lesions. *Gastroenterol Clin North Am* (2013), 42(2):261-84.

Yamamoto, N., Takizawa, T., Iwanaga, Y., Shimizu, N., and Yamamoto, N. Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Letters* (2000), 484: 153-158.

Yamamoto, N., Tokunaga, M., Uemura, Y., Tanaka, S., Shirahama, H., Nakamura T, Land, CE., and Sato, E .Epstein-Barr virus and gastric remnant cancer. *Cancer* (1994) ,1 74(3): 805-9.

Yanai, H., Shimizu, N., Nagasaki, S., Mitani, N., and Okita, K. Epstein-Barr virus infection of the colon with inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* (1999), 94: 1582-6.

Yeh, JM., Goldie, SJ., Kuntz, KM., and Ezzati, M. Effects of Helicobacter pylori infection and smoking on gastric cancer incidence in China: a population-level analysis of trends and projections. *Cancer Causes Control* (2009), 20(10):2021-9.

- Yeh, JM., Hur, C., Schrag, D., Kuntz, KM., Ezzati, M., Stout, N., Ward, Z., and Goldie, SJ. Contribution of H. pylori and smoking trends to US incidence of intestinal-type noncardia gastric adenocarcinoma: a microsimulation model. *PLoS Med* (2013), 10(5):e1001451.
- Yin, Y., Manoury, B., and Fahraeus, R. Self-inhibition of synthesis and antigen presentation by Epstein–Barr virus-encoded EBNA1. *Science* (2003), 301:1371–1374.
- Ying, HY., Yu, BW., Yang, Z., Yang, SS., Bo, LH., Shan, XY., Wang, HJ., Zhu, YJ., and Wu, XS. Interleukin-1B 31 C>T polymorphism combined with Helicobacter pylori-modified gastric cancer susceptibility: evidence from 37 studies. *J Cell Mol Med* (2016), 20(3):526-36.
- Yoshiwara, E., Koriyama, C., Akiba, S., Itoh, T., Minakami, Y., Chirinos, JL., Watanabe, J., Takano, J., Miyagui, J, Hidalgo, H., Chacon, P., Linares, V., and Eizuru, Y .Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma in Lima, Peru. *J Exp Clin Cancer Res* (2005), 24(1); 49-54.
- Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N., and Takada, K. Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* (1997), 71(7):5688-91.
- Yoshiyama, H., Shimizu, N., and Takada, K. Persistent Epstein-Barr virus infection in a human T-cell line: unique program of latent virus expression. *EMBO J* (1995), 1; 14(15):3706-11.
- Young, LS., and Rickinson, AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer* (2004), 4:757–768.
- Young, LS., and Murray, PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours . *Oncogene* (2003), 11; 22(33) pp. 5108–21.
- Young, LS., Yap, LF., and Murray, PG. Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. *Nat Rev Cancer* (2016), 16(12):789-802.
- Yoza, R., Ueda, Y., Sakuma, Y., Minami, N., Takahashi, K., Minamiguchi, S., Haga, H., Chiba, T. Slow Progression of Poorly Differentiated Gastric Carcinoma associated with Epstein - Barr virus Infection: 12-year Follow-up. *Intern Med* (2015), 12:1505-8.
- Yuen, JW., Chung, GT., Lun, SW., Cheung, CC., To, KF., and Lo, KW. Epigenetic inactivation of inositol polyphosphate 4-phosphatase B (INPP4B), a regulator of PI3K/AKT signaling pathway in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One* (2014), 15; 9(8):e105163.

Z

- Zhang, Q., Brooks, L., Busson, P., Wang, F., Charron, D., Kieff, E., Rickinson AB., and Tursz, T. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *Eur J Immunol.* (1994);24(6):1467-70
- Zhang, Q., Brooks, L., Busson, P., Wang, F., Charron, D., Kieff, E., Rickinson AB., and Tursz, T. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 increases HLA class II expression in an EBV-negative B cell line. *Eur J Immunol.* (1994);24(6):1467-70
- Zhao, B., Zou, J., Wang, H., Johannsen, E., Peng, CW., Quackenbush, J., Mar, JC., Morton, CC., Freedman, ML., Blacklow, SC., Aster, JC., Bernstein, BE.,and Kieff, E. Epstein-Barr

- virus exploits intrinsic B-lymphocyte transcription programs to achieve immortal cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2011), 6; 108(36):14902-7.
- Zhao, J., Liang, Q., Cheung, KF., Kang, W., Lung, RW., Tong, JH., To, KF., Sung, JJ., and Yu, J. Genome-wide identification of Epstein-Barr virus-driven promoter methylation profiles of human genes in gastric cancer cells. *Cancer* (2013), 15; 119(2):304-12.
- Zhu, JY., Pfuhl, T., Motsch, N., Barth, S., Nicholls, J., Grässer, F., and Meister, G. Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* (2009), 83(7):3333-41.
- Zimber-Strobl, U., and Strobl, LJ. EBNA2 and Notch signalling in Epstein-Barr virus mediated immortalization of B lymphocytes. *Semin Cancer Biol* (2001), 11(6):423-34.
- Zimber-Strobl, U., Kremmer, E., Grasser, F., Marschall, G., Laux, G., and Bornkamm, GW. The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 interacts with an EBNA2 responsive cis-element of the terminal protein 1 gene promoter. *EMBO J* (1993), 12:167-175.
- zur Hausen, H. Infections causing human cancer. (2006). *Wiley-VHC Weinheim-New York* (Publ), pp: 1-517.
- zur Hausen, A., Brink, AA., Craanen, ME., Middeldorp, JM., Meijer, CJ., van, den., and Brule, AJ. Unique transcription pattern of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-carrying gastric adenocarcinomas: expression of the transforming BARF1 gene. *Cancer Res* (2000), 60(10):2745-8.
- zur Hausen, A., van Grieken, NC., Meijer, GA., Hermsen, MA., Bloemena, E., Meuwissen, SG., Baak, JP., Meijer, CJ., Kuipers, EJ., and van den Brule, AJ. Distinct chromosomal aberrations in Epstein-Barr virus-carrying gastric carcinomas tested by comparative genomic hybridization. *Gastroenterology* (2001), 121(3):612-8.
- zur Hausen, A., van Rees, BP., van Beek, J., Craanen, ME., Bloemena, E., Offerhaus, GJ., Meijer, CJ., and van den Brule, AJ., Epstein-Barr virus in gastric carcinomas and gastric stump carcinomas: a late event in gastric carcinogenesis. *J Clin Pathol* (2004), 57(5): 487-91.
- zur Hausen, H., and Schulte-Holthausen, H. Presence of EB virus nucleic acid homology in a "virus-free" line of Burkitt tumour cells. *Nature* (1970), 18; 227(5255):245-8.
- zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., and Santesson, L. EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature* (1970), 12; 228(5276):1056-8.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2016, 8 (17):169-178
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Characteristics of gastric carcinoma associated with Epstein Barr virus in Algeria

Mouna Aslane¹, Abdulatif Al Haj², Akila Henneb³, Abdelhalim Khenchouche⁴, Karim Houali¹

¹Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Biology and Agronomy, University of Mouloud Mammeri, 15000 Tizi-ouzou, Algeria

²Department of Anatomy and Molecular Embryology, Ruhr- University, 150D-44801 Bochum, Germany

³Department of Pathology, Faculty of Medicine, University Hospital (CHU) of Nedir Mohammed, 15000 Tizi-Ouzou, Algeria

⁴Department of Microbiology, Faculty of nature sciences and life, University of Ferhat Abbas Sétif-1

ABSTRACT

Epstein-Barr virus is associated with gastric carcinoma. There has been no study about the frequency of Epstein Barr virus associated gastric carcinoma (EBVaGC) in Algeria an endemic area of nasopharyngeal carcinoma. The objective of this study is to investigate the prevalence of EBVaGC among Algerian patients and to define EBV latency patterns in this tumor. The expression of latent membrane protein-1 (LMP-1) was evaluated in EBV positive cases with specific monoclonal antibodies using immunofluorescence and immunohistochemistry techniques. 97 cases selected of gastric carcinoma were examined for EBV infection using fluorescence in situ hybridization assay to detect EBV-encoded small RNAs (EBER-1 and EBER-2). Combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization was carried out in 15 gastric carcinoma cases to confirm the presence of EBERs and LMP-1 simultaneously. We have shown that 22 out of 97 cases (22.7%) expressed EBV. EBERs were present within the malignant epithelial cells and in precancerous lesions showing dysplasia tissue, but in none of non-neoplastic cases. In addition, LMP-1 was expressed in 8 of 22 EBV-positive samples. The expression was membranous/cytoplasmic, restricted to the malignant cells and absent in non-neoplastic tissues. Combined immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization determined a colocalisation of EBERs and LMP-1 in gastric carcinoma cells. We conclude that the prevalence of EBVaGC is 22.7 % in Algeria with specific clinicopathologic features, and the type of latency is similar to the type of latency of nasopharyngeal carcinoma.

Keywords: Epstein Barr virus,, gastric carcinoma,, EBV-encoded small RNAs,, latent membrane proteins-1.,

INTRODUCTION

The Epstein Barr Virus (EBV) is a ubiquitous herpes virus infecting 95 % of world's population. EBV was the first virus shown to contribute to major cell proliferation disorders in humans; it is associated with wide variety of malignancies including Burkitt lymphoma[1], Hodgkin's disease[2], post-transplant lymphoproliferative disorder, nasopharyngeal carcinoma (NPC) and gastric carcinoma (GC)[1];[2]. They first detected EBV infection in undifferentiated lymphoepithelioma-like carcinoma (LELC) by polymerase chain reaction (PCR), it is an uncommon type characterized by marked stromal lymphocytic infiltration[3]. Subsequently, further investigation determined that EBV may be present in typical gastric adenocarcinoma and in adjacent dysplastic epithelia[4].

In contrast to other EBV-associated malignancies, such as endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma, EBV positive gastric cancer make up the largest group of EBV-associated malignancies with worldwide geographical variations (5 Takada, 2000). However, there are some regional differences in the incidence of EBV associated GC (EBVaGC), it is distributed from the highest (16-18%) in the USA and Germany to the lowest (4.3%, 3.9%) respectively in China and in Peru([5]; [6];[7]). EBVaGC exhibit some characteristic clinico-pathologic features such as high incidence in (LELC) and remnant gastric carcinoma, a male predominance and localization in the proximal stomach([8]; [9]). It is also related to diffuse histological subtype with abundant infiltrating lymphocytes and poor to moderate differentiation([10]; [6]).

The diagnosis of EBV infection requires not only the detection and localization of the viral genome but also the detection of viral gene products. In situ hybridization and immunostaining covers this point. The two small non-coding EBER-1 and EBER-2 are heavily transcribed and abundant RNAs EBV in latent infection[11]. In situ hybridization of EBERs is the gold standard assay to detect EBV latent infection in paraffin-embedded tissue sections[12]. Of the EBV proteins, latent membrane protein 1 (LMP-1) has been postulated to be the major oncogenic protein. LMP-1 can transform rodent fibroblast cell lines in nude mice and prevents cells from apoptosis to produce immortalized cells[13]. In human B cells, LMP1 is essential for B-lymphocyte transformation and immortalized state[14].

Gastric carcinoma represents the fourth most common type of cancer and the second leading cause of cancer related death worldwide[16]. In Algeria, the stomach cancer is the fifth most prevalent cancer among the Algerian population with the annual incidence of 5.5/100 000 persons[17]. Moreover, North Africa is one of the major nasopharyngeal carcinoma endemic regions[18]. The incidence of NPC is high in Algeria and it is also for Hodgkin and Burkitt lymphoma[19]. Precise information on EBVaGC especially on geographic differences of frequency is limited and there is no study about the prevalence of EBVaGC in Algeria.

The aim of the present study was to determine the frequency of EBV-related gastric carcinoma in cases from Algeria, using fluorescence in situ hybridization (FISH) for the detection of EBERs transcripts. Subsequently, we studied the EBV positive cases by immunohistology techniques with specific monoclonal antibodies for the detection of EBV latent membrane protein-1 (LMP-1). We additionally utilized sequential labeling for LMP-1 by immunofluorescence and EBER by fluorescence in situ hybridization to confirm the possible role of EBV in the pathogenesis of gastric carcinoma.

MATERIALS AND METHODS

Specimens

Formalin fixed-paraffin-embedded blocks from 113 surgically resected gastric specimens obtained from the pathology department of NEDIR Mohammed University Hospital, Tizi-ouzou, Algeria, between 2010 and 2013. This study was approved by the Medical Ethics Committee of the University Hospital of NEDIR Mohammed (Ref: CSF/SBSA/002013) in accordance with the guidelines of the Declaration of Helsinki 1975. For further molecular evaluations, the specimens selected were sent to the institute of anatomy and molecular embryology at Ruhr University Bochum Germany.

Pathologic characteristics

Among 113 cases studied, 97 cases were diagnosed with gastric carcinoma, 6 cases of pre-neoplastic gastric tissue (dysplasia) and 10 cases of non-neoplastic mucosa showing gastritis tissue. The clinical data concerning the age, sex, and anatomic site of tumor were evaluated by reviewing the medical charts and pathological records. Glass slides were reviewed to determine the histological types according to the criteria of [20] as intestinal type and diffuse type, the cases are sub-classified according to the guidelines of the [21] to papillary adenocarcinoma (pap), well differentiated tubular adenocarcinoma (tub1), moderately differentiated tubular adenocarcinoma (tub2), solid type poorly differentiated adenocarcinoma (por1), non-solid type poorly differentiated adenocarcinoma (por2), signet ring cell carcinoma (sig) and special type of poorly differentiated carcinoma (LELC).

PNA probe and antibodies

The probes used in this study are EBER PNA probes Y5200, purchased from Dako. Y5200 is a mixture of 4 different fluorescein-labeled PNA probe complementary to the EBERs RNA molecules (EBER-1 and EBER-2). An oligo (dT) control probe was used as a control for RNA preservation in histological sections. For the

detection of LMP-1 we have used two different mouse primary monoclonal antibodies: the S12 was kindly provides by Tadamas Ooka (Laboratoire de virologie moléculaire Lyon France) and the CS1-4 were obtained from Dako. Secondary antibodies used are Alexa Fluor 488 conjugated FITC (green) and Alexa fluor 568 conjugated TRITC (red) (Invitrogen, USA).

Fluorescence in situ hybridization

FISH was carried out for small EBV-encoded RNAs (EBER1-2) in paraffin-embedded tissue sections. Hematoxylin/eosin (HE) staining was done in adjacent section for histological identification of the site of fluorescence. The reaction was performed according to the manufacturer's instruction (PNA ISH detection kit, Dako) with slight modification. In brief, 4µm thick sections cut from paraffin block and mounted on amino-propyl triethoxysilane (sigma chemical) coated slides. The slides were dewaxed with xylene and rehydrated through alcohols to water, the sections were treated with proteinase K diluted with TBS for 30 minutes at 37° to increase their permeability to the probe and then passed in glycine diluted in TBS for 3s to inactivate proteinase K. Transferred to TBS.

Then the sections were hybridized with the EBER PNA probe for one hour at 55°C. The samples were washed two times in 40% formamide in 5xSSC at 55°C for 15 min followed by washing in 5xSSC for 15 min at 55°C and two times in 2xSSC for 15 min for each at RT. Slides were treated for 1h with blocking solution (Maleic acid buffer 10% w/v) at RT. To enhance fluorescence and photostability the Alexa fluor 488 signal amplification kit (molecular probes) was used; the slides were incubated with Alexa fluor488 rabbit anti-FITC to bind FITC labeled probes and then with Alexa fluor 488 goat anti rabbit IgG for further enhancement. After washing steps, the slides were mounted with Dako fluorescence mounting medium (Dako USA). The samples were examined under an LSM 510 confocal microscope (Carl Zeiss, Germany).

Immunofluorescence

The expression of latent membrane protein 1 was examined by immunofluorescence in all gastric carcinoma cases having detectable EBV by FISH. The sections were subjected to heat antigen retrieval in citrate buffer (pH: 6) for 10 min as described previously [22], followed by washing in TBSx3 and then incubated with primary antibody anti LMP-1 (S12) 100 µl diluted 1:500 in PBS for 1hour. The samples were washed in TBSx3 times followed by incubation with the secondary antibody goat anti-mouse Alexa fluor 488 (1:1000) (Invitrogen USA) for 1h in the dark. After washing steps, stained sections were evaluated by confocal microscope. The phenotype of cells expressed LMP-1 was determined by two-color immunofluorescence using anti LMP-1 (S12) and rabbit polyclonal anti-cytokeratin (CK7, ab90083 from abcam). The secondary antibodies used are goat anti-mouse Alexa fluor 488 for detection LMP-1 and goat anti-rabbit Alexa fluor 568 conjugated TRITC for detecting cytokeratine 7. Under confocal microscope, LMP-1 appears in green and cytokeratine 7 in red.

Immunohistochemical analysis

In order to confirm the results of immunofluorescence assays, immunohistochemical stains for LMP-1 were performed on all GC EBV positive samples. Known cases of LMP-1 positive Hodgkin lymphoma tissue was used as positive control. Paraffin sections pretreated with citrate for heat antigen retrieval, were incubated with the primary antibodies CS1-4 anti LMP-1 (1:200) for 1hour as described previously [22]. For detection protocol, the super sensitive non Biotin HRP Detection Kit EnVision (Dako Denmark) was used. Bound antibody was detected by diaminobenzidine chromogene (DAB, EnVision Kit) and tissues were counter-stained with hematoxylin.

Double labeling immunofluorescence and fluorescence in situ hybridization

In order to confirm the sensitivity of our FISH and IF protocols, we performed an end point double staining of LMP-1 by immunofluorescence and EBERs by fluorescence in situ hybridization. This technique was done on 15 cases of gastric carcinoma as described previously [23] with slight modification. Briefly, paraffin tissue sections were treated following dewaxing in xylene with proteinase K for predigesting step, the sections were then subjected to heat antigen retrieval in citrate buffer (pH: 6). The samples were incubated with primary antibody anti LMP-1 (S12) and then incubated with TRITC conjugated secondary antibody. The slides are then subjected to fluorescence in hybridization procedure with EBER PNA probe as described previously. Under confocal microscope, LMP-1 appears in red and EBERs in green.

Statistical analysis

For statistical analysis, we used the SPSS software. Relation of EBV status with independent variables including sex, age, tumor location and histological types was assessed by Chi square (χ^2) and P values ≤ 0.05 is considered statistically significant.

RESULTS

Prevalence of EBV positive cases and association with clinico-pathological characteristics

Out of 97 patients with confirmed gastric carcinoma, 22 cases (22.7%) were proven to be positive for EBV by means of EBERs RNA fluorescence in situ hybridization. Excluding LELC subtype, the frequency of EBV associated gastric adenocarcinoma was (18.5%). FISH and HE staining in each adjacent pair of histological sections showed that EBERs were present within the malignant epithelial cells (Fig.1). EBERs were also observed in 2 cases of precancerous lesions showing dysplasia tissue, but in none of non-neoplastic cases. EBERs negative cancer tissues occasionally harbored scattered EBER-positive lymphocytes. Positive signals were bright green appeared as several small spots in cell nucleus of GC and in a limited number of infiltrating lymphocytes.

The characteristics clinico-pathologic of EBV-positive GC cases and EBV-negative GC cases were summarized in (Table 1). We have not found a significant association between EBV expression and gender. Indeed, among patients developing EBVaGC, the frequency of male was higher than the frequency of female, but the difference was not statistically significant ($p=0.14$). However, patients with EBVaGC were aged between 45 to 60 years old and this association was statically significant ($p=0.029$). With regard to anatomic site of the tumor, the positive rate of EBVaGC in antrum tumors (27%) was higher than that in fundus or body tumors (15.3%, 21%) but the difference was not significant ($p=0.28$). Analysis of histological features based on Lauren's classification, showed that there are not a significant difference between diffuse type EBV-positive cases and intestinal type (28% vs 15%, $p=0.13$), but there was a significant difference between EBVaGC poorly differentiated grade and EBVaGC well and moderately grade ($p=0.045$).

Table1: Characteristics of EBV-positive GC cases and EBV-negative GC cases.

Clinical characteristics	Total (100%)	EBV expression		p -value
		Positive N (%)	Negative N (%)	
Gender				
male	67	18 (26.8)	49 (73.2)	$P=0.14$
female	30	4 (13.3)	26 (86.6)	
Age				
<45	29	4 (13.8)	25 (86.2)	$P=0.029$
45-60	27	11 (40.8)	16 (59.2)	
>60	41	7 (17.0)	34 (82.9)	
Location				
fundus	26	4 (15.3)	22 (84.6)	$P=0.28$
body	19	4 (21.0)	15 (79)	
antrum	52	14 (27)	38 (73)	
Lauren type				
intestinal	40	6 (15)	34 (85)	$P=0.13$
diffuse	57	16 (28)	41 (72)	
differentiation Degree				
well	21	2 (9.5)	19 (90.4)	$P=0.045$
moderate	19	3 (15.8)	16 (84.2)	
poor	57	17 (30)	40 (70)	

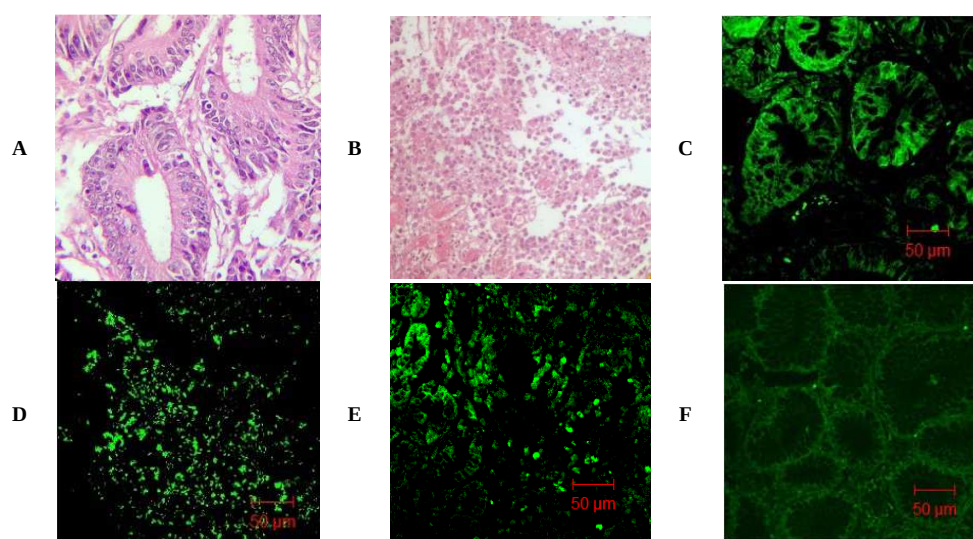


Figure 1. EBERs in situ hybridization in gastric carcinoma. A and B: Hematoxylin Eosin staining in adjacent sections for respectively C and D (original magnification x400). C: Positive signals for EBERs in well differentiated adenocarcinoma. D: Positive signals for EBERs in poorly differentiated adenocarcinoma. E: Positive signals for EBERs in moderately to poorly differentiated adenocarcinoma. F: Negative signal in well differentiated adenocarcinoma.

Of the intestinal types, EBV involvement was greater among moderately differentiated tubular adenocarcinoma as compared to well differentiated tubular adenocarcinoma (20% vs11.7%), (Table 2). In addition, of the diffuse type, solid poorly differentiated adenocarcinoma and signet-ring cell carcinoma have the highest proportions of EBV positive cases (34.8% and 20%) except lymphoepithelioma-like carcinoma cases which are known to be strongly associated with EBV (66.6%). In summary, EBVaGC in Algerian patients was associated with age at diagnosis and have preference of poor differentiation tumors.

Detection of latent membrane protein LMP-1

Two methods were used to evaluate the expression of LMP-1 in all 22 GC cases EBV positive. Immunofluorescence using S12 anti-LMP-1 revealed that LMP-1 was present in 8/22 (36.4%). IF staining showed the absent of LMP-1 expression in non-neoplastic cells and presence of expression in almost all carcinoma cells (Fig. 2 (a,b)). Two-color immunofluorescence of LMP-1 and cytokeratin defined the phenotype of LMP-1 expressing cells as epithelial cells (Fig. 2(c)). We performed immunohistochemical stains using CS1-4 anti-LMP-1 to confirm the presence of LMP-1 expression in EBVaGC samples. A high concordance was found between (IF) and (IH) staining with a similar trend: all 8 (100%) LMP-1 positive cases determined by IF were also confirmed to be positive by IH. All 14 negative cases by IF were also negative by IH.

Immunohistochemical staining gives more morphological detail in the tissue compared to immunofluorescence, when present; LMP-1 was membranous/cytoplasmic, restricted to the malignant cells and absent in adjacent normal tissues as shown in (Fig. 3). Positive control using known LMP-1 positive Hodgkin lymphoma tissue, revealed a distinctive cytoplasmic and membranous stain.

Table 2. EBV associated gastric carcinoma by sex and histological type

* Papillary adenocarcinoma. † Well differentiated tubular adenocarcinoma. ‡ Moderately differentiated tubular adenocarcinoma. § Solid type poorly differentiated adenocarcinoma. || Non-solid type poorly differentiated adenocarcinoma. # Signet ring cell carcinoma and special type of poorly differentiated carcinoma lymphoepithelioma-like carcinoma(LELC).

Histological classification	Total		Male		Female	
	N	(%)	N	(%)	N	(%)
Intestinal	6/40	(15)	5/30	(16.6)	1/10	(10)
pap*	0/3	(0)	0/3	(0)	0/0	(0)
tub1†	2/17	(11.7)	2/12	(16.6)	0/5	(0)
tub2‡	4/20	(20)	3/15	(20)	1/5	(20)
Diffuse	16/57	(28)	13/37	(35.1)	3/20	(15)
por1§	8/23	(34.8)	6/16	(37.5)	2/7	(28.5)
por2	2/18	(11.1)	2/13	(15.4)	0/5	(0)
sig#	2/10	(20)	2/5	(40)	0/5	(0)
LELC	4/6	(66)	3/3	(100)	1/3	(33)

Co-localization of EBERs and LMP-1

Combined immunofluorescence for LMP-1 and fluorescence in situ hybridization for EBERs was carried out in 15 cases of gastric carcinoma. In five cases, double labeling was positive for both EBER and LMP-1. Ten cases were negative for EBER and negative for LMP-1. Double staining experiments and confocal microscopy revealed that LMP-1 expression was largely identical to the EBER positive signal. Overlaying the images showed co-localization of the LMP-1 and the EBER specific signals (Fig.4).

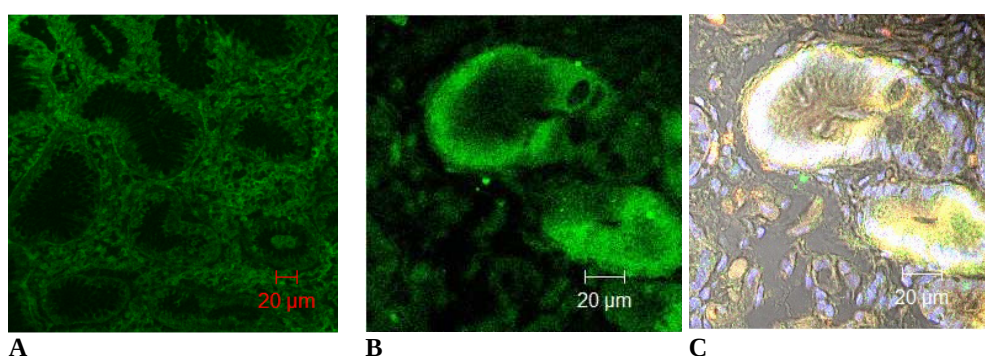


Figure 2: Immunofluorescence for latent membrane protein LMP-1. A: Negative signal in non-neoplastic gastric tissue. B: Positive signal found in well differentiated gastric carcinoma. C: Two-color immunofluorescence for simultaneous detection of LMP-1 (green) and cytokeratin (red) in well differentiated gastric carcinoma shows similar patterns of labeling (yellow).

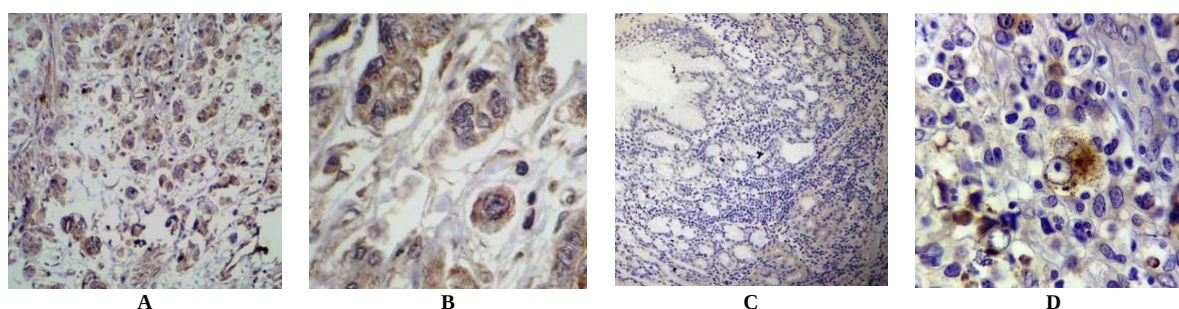


Figure 3: Immunohistochemical stain for LMP-1. A: LMP-1 expression in poorly differentiated adenocarcinoma EBV positive. B: Positive signal for LMP-1 is restricted to cytoplasmic and membrane of tumor epithelial cell (brown signal, full arrow). C: Negative signal observed in non-neoplastic gastric epithelium. D: Positive control shows LMP-1 expression in reed Sternberg cell of Hodgkin lymphoma. Original magnification (A, C x 400) and (B, D x 1000).

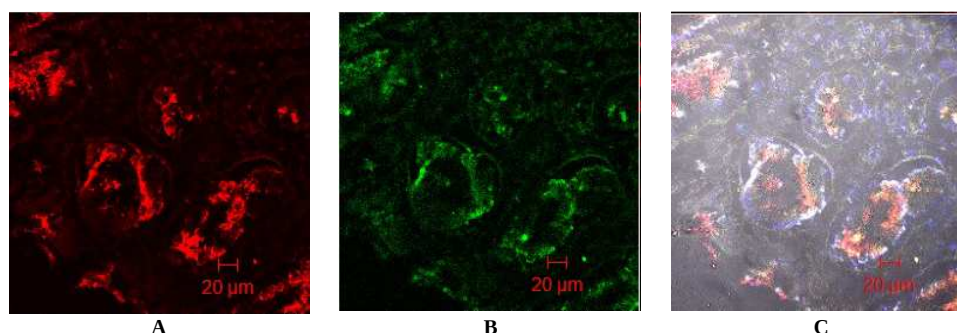


Figure 4: Dual staining immunofluorescence for LMP-1 and fluorescent in situ hybridization for EBVs shows. A: LMP-1 expression (red) and B: EBVs positive signal (green) in gastric carcinoma. C: Confocal analysis shows similar patterns of labeling and overlaying the images reveals colocalisation of the signals, yellow tissue section.

DISCUSSION

This study is the first to determine the frequency of EBVaGC in cases from Algeria; we found a 22.7% prevalence of EBV related gastric carcinoma in Algeria. Among them, there were LEL carcinomas cases, which are strongly associated with EBV. Excluding this type of GC, the prevalence of EBV associated gastric adenocarcinoma was 18.5%; this frequency is among the highest frequency worldwide.

Actually it is well known that there are some regional differences in incidence of EBVaGC worldwide, Report from Asian countries example Japan and China, revealed a frequency comprises between 5.6 to 13.5%([24]; [25]; [26]), it can reach up to 18% as shown in Germany([24]; [27]). In North Africa, only one paper published from Tunisia, which showed that the frequency of EBV related GC was 14.81%([28]). It seems that economic conditions are not an important variable for EBVaGC because low and high frequencies were found in both developed and developing countries ([29]; [8]). We suggest that environmental and lifestyle factors, host genetic and strain variation of EBV are likely to have a role in this high prevalence of EBVaGC in Algeria. Further investigations are necessary in order to determine the strain of EBV in gastric carcinoma from Algerians patients and study the environmental factors in this area.

In this study, we found specific nuclear EBER1-2 transcripts in GC cells and in dysplastic gastric epithelium. Scattered EBER positive lymphocytes were found in some EBER-negative GC tissues which is shown also in previous report[30]. In addition, we did not detect EBV in non-neoplastic gastric tissues. Our finding of EBV infection in precancerous lesion is in agreement with the result of Shibata and Weiss[4], and others authors([31]; [32]). This finding supports the theory that EBV infection occurred before transformation and the mechanism of the entry of the virus into gastric epithelial cells are related to previous damages and cooperation with some unknown promoter factors.

EBER in situ hybridization has become today the gold standard method for the detection of latent EBV infection in clinical formalin fixed paraffin embedded (FFPE) sections[33]. In this study, Fluorescence in situ hybridization was used to detect EBER in GC using a commercially available EBER PNA probe. The probe is currently used to detect EBV infection in FFPE tissue specimens.[34] have used this probe in a FISH assay.[35] used EBER PNA probes in FISH assay and succeeded in simultaneously staining for both EBER and surface antigens. Recently, a study reported by [36] showed the efficiency and feasibility of FISH in the detection of EBER in FFPE tissue section of NPC. Subsequently, [37] tested FISH to detect EBV in GC biopsy specimens, they showed that this technique gives high sensitivity results even more slightly higher than that of chromogene in situ hybridization. Despite FISH showed less morphological detail in the tissue such as conventional ISH, but it can still localize EBER signal in gastric carcinoma cells.

About the clinico-pathological features of EBVaGC, we have observed an association with age of patients. Indeed, EBVaGC was more frequently found between 45 and 60 years. Previous study reported the association of EBVaGC with age. In fact, [38] showed that EBVaGC was highly associated with older patients, while Herrera-Goepfert *et al.*, 2005.[32] reported that EBVaGC are common in younger age in Mexican population. However, other studies reported by [39] showed no association with age of patients. The second statistical association found in our study

was the tendency of EBVaGC with poorly differentiation tumors. These results are in agreement with those of several previous studies ([8]; [6]; [28]).

In addition, we don't observe a significant association between EBV expression and gender, tumor location and histology type. Ours results are similar to those observed in Tunisia[28]. However, several studies have reported that patient with EBVaGC were predominately male and the tumor arise more frequently in the proximal stomach ([4]; [9]; [10]). Furthermore, many studies reported that EBV expression exhibited significant association with diffuse type of GC ([10]; [8]; [6]). The difference between ours results and other reports can be attributed to the influence of the characteristics of the cohort, genetic background, environmental factor and life style on the development of EBVaGC.

LMP-1 is a 62-kd integral protein expressed in the cytoplasm and cell membrane. It plays a major role in cancer development by the ability to activate a wide range of signaling pathways such as NFκB and EGFR[15]. Recent studies confirm that LMP-1 is involved in the pathogenesis of some EBV related epithelial carcinoma as lake nasopharyngeal carcinoma[40]. Other studies showed the presence of LMP-1 in cervical carcinoma from Algerian woman[41]. Previously, it was found that LMP-1 can be secreted in the serum of NPC patients[42].

In our study, we have applied two different techniques using two different antibodies against LMP-1 in gastric carcinoma EBV positive, a high concordance was found between immunofluorescence using S12 antibody and immunohistochemistry using CS1-4 antibody. LMP-1 was observed in 8 of 22 EBVaGC, the expression was cytoplasmic and membranous in malign cells, and non expression was found in non-neoplastic gastric cells. In addition, we have applied double immunofluorescence staining of LMP-1 and cytokeratin; this technique defined the phenotype of LMP-1 expressing cells as epithelial cells.

The presence of LMP-1 in the EBVaGC was controversial. While some author's report that LMP-1 was present in their study.[43]demonstrated LMP-1 in 2 of 6 cases;[44],have found detectable amounts of LMP-1 expression in 3 of 12 cases of EBV positive GC. However, some studies showed absence of LMP-1 expression in GC ([9];[25];[45]).The lack of LMP-1 does not argue in a possible role for this viral protein in the pathogenesis of the tumor, but rather indicates that a continued LMP-1 expression may not be necessary once the malignant phenotype is established.

Using double staining FISH and IF, we are the first to detect simultaneously both EBER and LMP-1 in GC tissue. The technique was carried on 15 cases; five cases were simultaneously EBER positive and LMP-1 positive, ten cases were both EBER negative and LMP-1 negative. Double staining is more effective than either assay alone for identifying EBV related disease. The colocalisation of EBER and LMP-1 confirm the etiologic role of EBV in the pathogenesis of gastric carcinoma.

CONCLUSION

In conclusion, our study is the first to describe the frequency of EBVaGC in Algeria, highlighting a high prevalence. Our finding of the presence of EBV in pre-neoplastic tissue supports the hypothesis that EBV infection precedes transformation. Furthermore, LMP-1 expression indicate not only that EBV is present in latently infected cells which is similar to the type of EBV latency of nasopharyngeal carcinoma, but it supports the concept of an etiologic role of EBV in the pathogenesis. Further investigations are necessary in order to obtain information regarding the biological behavior of EBVaGC in Algerians patients.

Acknowledgments

The authors wish to thank members of anatomy and embryology laboratory of Ruhr University Germany and of members of anatomy and pathology laboratory of Nedir Mohammed (CHU) Tizi- ouzou Algeria for their helpful contribution to this project.

REFERENCES

- [1] Zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P. & Santesson, L. (1970). *Nature* 228, 1056-8.

- [2] Rickinson, A. & Kieff, E. (2007). Epstein-Barr virus. In *Fields Virology*, 5th edn, pp, 2655-2700, Edited by. Knipe, B.M & Howley, P.M. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins.
- [3] Burke, A.P., Yen, T.S., Shekitka, K.M. & Sobin, L.H. (1990). *Mod Pathol*3, 377-80.
- [4] Shibata, D. & Weiss, L.M. (1992). *Am J Pathol*140, 769-74.
- [5] Takada, K. (2000). *Mol Pathol*53, 255-61.
- [6] Camargo, M.C., Murphy, G., Koriyama, C., Pfeiffer, R.M., Kim, W.H., Herrera-Goepfert, R., Corvalan, A.H., Carrascal, E. & other authors. (2011). *Br J Cancer* 105, 38-43.
- [7] Yoshiwara, E., Koriyama, C., Akiba, S., Itoh, T., Minakami, Y., Chirinos, J.L., Watanabe, J., Takano, J., Miyagui, J. & other authors. (2005). *J Exp Clin Cancer Res*24, 49-54.
- [8] Lee, J.H., Kim, S.H., Han, S.H., An, J.S., Lee, E.S. & Kim, Y.S. (2009). *J Gastroenterol Hepatol*24, 354-65.
- [9] Truong, C.D., Feng, W., Li, W., Khoury, T., Li, Q., Alrawi, S., Yu, Y., Xie, K., Yao, J. & other authors. (2009). *J Exp Clin Cancer Res*3, 28-14.
- [10] Corvalan, A., Koriyama, C., Akiba, S., Eizuru, Y., Backhouse, C., Palma, M., Argandoña, J. & Tokunaga, M. (2001). *Int J Cancer*94, 527-30.
- [11] Clemens, M.J. (1993). *Mol Biol Rep*17, 81-92.
- [12] Gulley, M.L. (2001). *J Mol Diagn*3, 1-10.
- [13] Rowe, M., Peng-Pilon, M., Huen, D.S., Hardy, R., Croom-Carter, D., Lundgren, E. & Rickinson, A.B. (1994). *J Virol*68, 5602-12.
- [14] Sun, L., Zhao, Y., Shi, H., Ma, C. & Wei, L. (2015). *Oncol Rep*33, 2253-60.
- [15] Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. Pisani, P. (2005). Global cancer statistics, 2002 *CA Cancer J Clin*55, 74-108.
- [16] Hamdi Cherif, M., Serraino, D., Mahnane, A., Laouamri, S., Zaidi, Z., Boukharouba, H., Cherka, D., Rakeb, M., Kara, L. & other authors. (2014). *BMC Cancer*30, 14-637.
- [17] Feng, B.J., Jalbout, M., Ayoub, W.B., Khyatti, M., Dahmoul, S., Ayad, M., Maachi, F., Bedadra, W., Abdoun, M. & other authors. (2007). *Int J Cancer*121, 1550-5.
- [18] Belkaid, M.I., Zerhouni, F., Beljord, K., Brière, J., Assouak, W., Djebbara, Z., Andrieu, J.M. & Colonna, P. (1995). *Bull Cancer*82, 357-63.
- [19] Lauren, P. (1965). *Acta Pathol Microbiol Scand*64, 31-49.
- [20] Japanese Gastric Cancer Association. (1999). Japanese classification of gastric carcinoma. 13 th edition. Tokyo: Kanehara 800. Ltd.
- [21] Niedobitek, G. & Herbst, H. (2001). In situ detection of Epstein-Barr virus DNA and viral gene products. In: *Epstein Barr virus protocols*, pp. 79-91. Edited by, Wilson J.B., May GHW, Humana Press.
- [22] Herbst, H. & Niedobitek, G. (2001). *Methods Mol Biol*174, 93-102.
- [23] Grinstein, S., Preciado, M.V., Gattuso, P., Chabay, P.A., Warren, W.H., De Matteo, E. & Gould, V.E. (2002). *Cancer Res*62, 4876-8.
- [24] Zur Hausen, A., van Rees, B.P., van Beek, J., Craanen, M.E., Bloemena, E., Offerhaus, G.J., Meijer, C.J. & van den Brule, A.J. (2004). *J Clin Pathol*57, 487-91.
- [25] Uozaki, H. & Fukayama, M. (2008). *Int J Clin Exp Pathol*1, 198-216.
- [26] Nakamura, S., Ueki, T., Yao, T., Ueyama, T. & Tsuneyoshi, M. (1994). *Cancer*73, 2239-49.
- [27] BenAyed-Guerfali, D., Ayadi, W., Miladi-Abdennadher, I., Khabir, A., Sellami-Boudawara, T., Gargouri, A. & Mokdad-Gargouri, R. (2011). *Virol J* 3, 8- 500.
- [28] Luo, B., Wang, Y., Wang, X.F., Liang, H., Yan, L.P., Huang, B.H. & Zhao, P. (2005). *World J Gastroenterol*11, 629-33.
- [29] Ryan, J.L., Morgan, D.R., Dominguez, R.L., Thorne, L.B., Elmore, S.H., Mino-Kenudson, M., Lauwers, G.Y., Booker, J.K. & Gulley, M.L. (2009). *Lab Invest*89, 80-90.
- [30] Gulley, M.L., Pulitzer, D.R., Eagan, P.A. & Schneider, B.G. (1996). *Hum Pathol*27, 20-7.
- [31] Herrera-Goepfert, R., Akiba, S., Koriyama, C., Ding, S., Reyes, E., Itoh, T., Minakami, Y. & Eizuru, Y. (2005). *World J Gastroenterol*11, 6096-103.
- [32] Herrmann, K. & Niedobitek, G. (2003). *J Pathol*199, 140-5.
- [33] Just, T., Burgwald, H. & Broe, M.K. (1998). *J Virol Methods*73, 163-74.
- [34] Kimura, H., Miyake, K., Yamauchi, Y., Nishiyama, K., Iwata, S., Iwatsuki, K., Gotoh, K., Kojima, S., Ito, Y. & other authors. (2009). *J Infect Dis*200, 1078-87.
- [35] Chen, H.L., Peng, J., Zhu, X.B., Gao, J., Xue, J.L., Wang, M.W. & Xia, H.S. (2010). *Exp Mol Pathol*89, 367-71.
- [36] Peng, J., Chen, H.L., Zhu, X.B., Yang, G.F., Zhang, Z.L., Tian, Z.Q. & Pang, D.W. (2011). *J Nanosci Nanotechnol*11, 9725-30.
- [37] Karim, N. & Pallesen, G. (2003). *Malays J Pathol*25, 45-7.

-
- [38]Chapel, F., Fabiani, B., Davi, F., Raphael, M., Tepper, M., Champault, G. & Guettier, C. (2000). *Histopathology*36, 252-61.
- [39]Dawson, C.W, Eliopoulos, A.G, Blake, S.M, Barker, R. & Young, L.S. (2000). *Viol* 272, 204-17.
- [40]Khenchouche, A., Sadouki, N., Boudriche, A., Houali, K., Graba, A., Ooka, T. & Bouguermouh, A. (2013). *Viol J10*, 340
- [41]Houali, K., Wang, X., Shimizu, Y., Djennaoui, D., Nicholls, J., Fiorini, S., Bouguermouh, A. & Ooka T. (2007). *ClinCancer Res*13, 4993-5000.
- [42]Harn, H.J., Chang, J.Y., Wang, M.W., Ho, L.I., Lee, H.S., Chiang, J.H. & Lee, W.H. (1995). *Hum Pathol*26, 267-71.
- [43]Shin, W.S, Kang, M.W., Kang, J.H, Choi, M.K, Ahn, B.M, Kim, J.K, Sun, H.S. & Min, K.W. (1996). *Am J ClinPathol*105, 174-81.
- [44]Hoshikawa, Y., Satoh, Y., Murakami, M., Maeta, M., Kaibara, N., Ito, H., Kurata, T. & Sairenji, T. (2002). *J Med Virol*66, 351-9.



Scholars Research Library

Der Pharmacia Lettre, 2016, 8 (19):70-77
(<http://scholarsresearchlibrary.com/archive.html>)



Protein profile and search for diagnostic markers in gastric cancer patients in Algeria

Djouza Salmi¹, Mouna Aslane¹, Akila Hennab², Boussad Metna³, Yacine Titouche¹
and Karim Houali^{1*}

¹Laboratory of Analytical Biochemistry and Biotechnology, University of Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algeria

²Laboratory of cytological and pathological anatomy CHU Nedir Mohamed Tizi-Ouzou, Algeria

³Laboratory of Forestry, University of Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, Algeria

ABSTRACT

Gastric cancer is one of the most common cancers in the world with one million new cases each year. It remains the second leading cause of death by cancer for both sexes. In Algeria, it represents 5% of all cancers listed and it comes in the fifth position with 1430 new cases each year. Gastric cancer was associated with Epstein-Barr virus (EBV) with an incidence of 10 to 18%. The LMP-1 protein is considered as the major EBV oncogene. Thanks to its signaling, LMP1 presents immortalization and transformation properties, able of inhibiting cell differentiation. The most promising approach to reduce mortality from gastric cancer is the early diagnosis by identifying specific and sensitive biomarkers. It is in this context that we first realized electrophoresis on cellulose acetate plates of the sera of patients with gastric cancer. The proteinogram obtained are, in general, very similar and they have a uniform appearance like paths known to be normal. Some of them have hypo-proteinemia and hypo-albuminemia in relation with inflammation and protein losses by digestive bleeding. In a second step, we performed SDS-PAGES to compare protein profiles of sera of gastric cancer subjects with those of healthy subjects. We have noted the existence of an additional band of 27 kDa in 20% of gastric cancer topics we found a disparity concerning the 18 kDa band which is present in 65% of patients and only in 43% of subjects healthy. Then, we performed ELISA on sera and on protein extracts of gastric biopsies to look for the presence of the LMP1 protein. The latter was detected in about 50% of cases. In healthy subjects, the samples were negative. By statistical tests, we have shown that the protein is expressed without regard to the patient's age or stage of cancer progression. LMP-1 may thus, serve as a biomarker for the diagnosis of EBV positive gastric cancer.

Keywords: Gastric cancer, EBV-LMP1, SDS-PAGE, proteinogram.

INTRODUCTION

Gastric cancer represents 7.8% of all new cancer cases, making it currently the fourth cancer in the world [1] [2]. It is the second leading cause of death with cancer in both sexes (736 000 deaths, 9.7%). His prognosis remains delicate with a survival rate of about 15% at 5 years [3].

Food or environmental risk factors such as alcohol and smoking, most likely, play a major role in the occurrence of the disease, in addition to this, the genetic factors. It has been demonstrated that the molecular mechanisms underlying gastric cancer include, most commonly, alterations in oncogene, tumor suppressor genes, cell cycle regulators, cell adhesion molecules and repair genes DNA [4].

Epstein Baar (EBV) is a ubiquitous virus with more than 95% of the adult world population that carries the trace of the primary infection. The oncogenic role of EBV was suspected very early, due to the ability of the virus to

immortalize human B cells *in vitro*. These cells contain the viral genome in the latent state, expressing different viral proteins [5].

Gastric cancers were associated with EBV infection since 1990. The association was first described in a rare form of gastric tumor, identical to EBV-positive carcinomas observed in other organs, including the nasopharynx, and known under the name of the undifferentiated carcinoma with lymphoid stroma [6]. It was later shown that all conventional gastric adenocarcinoma histological types can be linked to EBV infection [7].

LMP1 (Latent Membrane Protein 1) considered as major EBV oncogene and is responsible for many phenotypic changes in cells infected with EBV [8]. According to DAWSON [9], the expression of LMP1 led to the diversion and the chronic deregulation of cellular signaling pathways and their target genes involved particularly in proliferative processes.

Because gastric cancer presents discrete clinical symptoms, often late and nonspecific, indicate a disease already locally advanced or metastatic [10]. The identification of the disease in an early stage may be the most promising approach to reduce gastric cancer mortality, hence the need to search for sensitive and reliable biomarkers for Earlier Diagnosis.

MATERIALS AND METHODS

We collected 20 sera samples of gastric cancer patients at the University Hospital of Tizi-Ouzou, and 20 sera samples from healthy subjects and 15 biopsies of gastric cancer.

2-1-Serum protein electrophoresis on cellulose acetate

The analysis was conducted on 20 serum samples from subjects with gastric cancer. We assayed the total protein by the automatic method (Beckman Coulter CX9) adopting the principle of the Biuret method.

Cellulose acetate plate, are previously immersed in a buffer solution for 20 minutes. 10 μ l of serum is then deposited on the plate. Immediately after electrophoresis migration carried out at pH 8.6 and at a voltage of 180 volts for 16 minutes, the plate is disclosed in a coloring bath at ponceau red at 0.5% where it is completely immersed for 6 minutes. The plate was then distained in three successive baths of acetic acid at 5%, 2 minutes each.

The plate is transferred in a pure methanol bath where it is left dipping for 4 minutes. The plate is then transferred to a lightening solution composed of glacial acetic acid at 29%, of absolute methanol at 67% and of 4% lightening reactant for 10 minutes. In order to complete the brightening, the plate is dried in an oven heated at 37-40 °C for ten minutes.

At the end of the practical realization, the result is visible on the cellulose acetate plate and can then be read by a densitometer (Helena junior 24) using a wavelength of 525 nm.

2-2-SDS-PAGE of serum proteins in the presence of β -mercaptoethanol

We used the method of LAEMMLI [11] which involves using a biphasic system with a stacking gel of 4%, in 0.5 M Tris-HCl buffer pH 6.8 and a separating gel in Tris-HCl buffer 1.5M pH 8.8. In order to better separate proteins with the MM 50 to 10 kDa, we conducted our analyses on a separation gel 17%. The polymerization thereof is initiated by ammonium persulfate and TEMED.

The samples are first diluted 1/2 with a solution RIPA (Radio Immuno Precipitation Assay). Thus, depending on the serum proteins of each sample, and to make deposits of 70 to 100 micrograms of proteins per well, we pipetted the required amount of serum, supplemented with 5 μ l of denaturing solution to 4X, containing SDS, the β -mercaptoethanol and bromophenol blue.

The samples are placed in alternating wells between the sera of healthy subjects and subjects with gastric cancer. A size marker Page Ruler™ More Prestained Ladder (Fermentas LIFE SCIENCE) is used. This kit includes 9 pre-stained proteins with the following MM: 250, 130, 95, 72, 55, 36, 28, 17 and 10 kDa. The migration of the proteins is performed at room temperature under a DC voltage of 200 V and a current of 20 mA for two hours and a half.

At the end of electrophoresis, the gels were removed, the proteins are first fixed in 12% TCA solution (w/v) for 45 minutes, and then stained for one hour by Coomassie Blue R250 in an amount of 0, 2% (w/v). To reveal the electrophoresis bands, we proceed to the discoloration of the immersion of the latter by gel in a mixture of water, methanol and acetic acid in proportions of 3.12 / 1.5 / 0.37 (v/v/v).

2-3-Extraction of tissue proteins in gastric tumors

In order to achieve ELISA on gastric cancer biopsies, we proceed to the extraction of tissue proteins. For this purpose, it carried out a tissue grinding for each gastric tumor, then, we take back the cell pellets in 700µl of RIPA added with 70µl of anti-proteases (Trypsin Inhibitor type I-S from Soybean). The sample is then sonicated (Sonicator Advantage-Lab AL) twice for one minute at a power of 20 W amplitude in ice. It is finally centrifuged (centrifuge: Sigma 4-16 K) at 10,000 g at 4 °C for 15 min. The supernatant containing the protein is recovered.

2-4-Search of membrane protein LMP1 latency by ELISA

We estimated the value of the LMP-1 by using the ELISA test, which is best suitable for a clinical diagnosis. This search is performed on all serum samples and protein extracts obtained from gastric biopsies, and also on samples of healthy subjects sera.

3ul of serum or protein extract supplemented with 50ul PBS are incubated overnight at 4°C (coating). After washing, we proceed to the saturation of the plate with 2% BSA (in PBS) and incubated for one hour at 37 °C. 100 µl of monoclonal antibody LMP1 S12 are added to each well at 0.1 µg / ml and incubated at 37 °C for two hours. We add then, the anti-mouse peroxidase-coupled at 0.1 µg / ml antibody and incubated for 30 minutes at 37 °C. 50 µl/ml of tetramethylbenzidine (TMB) are later added and the plate is placed in the dark for 10 minutes at room temperature. To stop the reaction, 50 µl/ml phosphoric acid 0.1M and the reading is done at 450 nm by an ELISA reader (BioTek).

In this analysis, we used as a negative control serum derived from umbilical cord, which is supposed to contain no protein of the Epstein Barr virus, since not contaminated by it. We also used as a positive control protein extract cells from a lineage P3HR1 expressing LMP-1.

RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Study of results obtained by serum protein electrophoresis on cellulose acetate

At basic pH, the majority of serum proteins are negatively charged. They migrate from the cathode to the anode and are separated into five fractions. Albumin which carries a significant negative charge migrates further toward the anode. Other proteins are a heterogeneous group of proteins, which are divided into four different sections: the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ globulins, β and γ globulins.

The proteinogram obtained are generally very similar. They have a pace consistent with normal path, referenced in the literature. They do not show significant changes that may be characteristic of a particular syndrome. Almost all patients had normal proteinogram with proteinemia and concentrations of each protein fraction consistent with referential values used.

Table I: Variation of proteinemia and different protein fractions of patients

Samples	Proteinemia 60 - 80 g/l	Albumin 31- 50 g/l	$\alpha 1$ globulin 1 - 4 g/l	$\alpha 2$ globulin 7 - 13,5 g/l	β globulin 6 - 13,5 g/l	γ globulin 9 - 18 g/l
M01	64	33,9	1,7	8,7	6,7	13
M02	69	28,9	2,7	10,7	13,8	12,9
M03	83	38,4	2,8	12,5	11	18,3
M04	71	27,4	4,7	13,2	13,7	11,9
M05	81	39,5	3,9	12	11,7	13,9
M06	75	31,7	3,3	12,4	9,5	18
M07	103	35,8	3,3	15,1	17,1	31,6
M08	63	34,1	2,4	8,3	10,1	8,2
M09	70	31,1	2,3	9,7	10,3	16,5
M10	58	27,1	2,4	6,8	10,2	11,6
M11	80	43,3	3,2	9,8	11,3	12,5
M12	80	41,7	2,9	10,8	9,5	15
M13	58	28,2	2,2	10,1	7,3	10,2
M14	60	22,9	2,4	11,8	7,3	15,6
M15	45	20,4	2,1	6,8	3,9	11,7
M16	68	29,4	4	12,8	12,1	9,8
M17	75	32,2	4,5	9,3	10,5	18,4
M18	65	35,3	3,2	10,5	9,3	6,7
M19	69	31,4	5,1	10,6	8,5	13,3
M20	60	27,2	2,7	9,5	8,6	12

We have, however, found hyper-total protein in the patient M7 accompanied with increased concentrations of $\alpha 2$ fractions, β and γ globulins. We also demonstrated a hypo-proteinemia 45 g/l in the M15 patient with decreased

levels of albumin and globulin β . As we have noted a significant hypoalbuminemia in subjects M14. The different variations of low magnitudes which have been identified are likely due to the presence of some artifacts during the analysis

The hyper-proteinemia seen in the M7 patient could be caused by a hyper-gammaglobulin polyclonal corresponding to an increase of all Ig classes following an immune response [12], as we also noted in this patient an increase in the concentration of the fraction of gammaglobulin with 31.6 g/l. The hypo-proteinemia are usually accompanied by hypo-albumin that could reveal the beginning of an inflammatory syndrome or caused by the increased of protein loss during gastrointestinal bleeding [13] [14].

The clinical symptoms of gastric cancer reported that patients most often suffer from localized pain in the abdomen, the pain testify to the affection of the stomach wall [15]. This complies with the work of WHICHER [13], which reports that the hypo-proteinemia can be caused by increased protein loss by leakage caused by digestive gastric bleeding. In addition, gastric cancer patients also complain of nausea and early satiety sensation which leads to a significant weight loss [16]. The work of Reif [14] confirmed that the patients' weight loss can be associated with hypo-proteinemia.

However, gastric cancer patients showed no profiles electrophoresis characteristics of the disease that could allow practitioners to a preliminary diagnosis of proteinemia since variations and concentrations of protein fractions are only isolated cases.

3.2. Study of protein profiles of serum proteins obtained by SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoethanol

Human serum contains a variety of proteins with very different concentrations, which makes the difficulty of a specific study of these proteins and the desired assessing their role in the pathology studied [17].

The protein bands identified by SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoethanol can be divided into major protein bands which are those that are almost always observed in normal human sera and minor bands that weakly or not appear at all in normal serum, but which may be characteristics of an electrophoresis profile referring to a given clinical situation [17].

The analysis of the electrophoresis profiles obtained by SDS-PAGE across the samples of sera analyzed both those of the healthy and those of gastric cancer subjects have in general a certain similarity and homogeneity concerning the presence of different bands and areas. We note, however, a disparity regarding the band 18 kDa which is present in 65% of patients with gastric cancer and only in 43% of healthy subjects. Furthermore, we found in 20% of sick individuals the presence of an additional band of 27 kDa.

The objective of the study of protein profiles obtained by SDS-PAGE is the determination of biomarkers, which would have the effect of distinguishing the occurrence of the pathological state. However, serum analysis is analytically difficult because of the high dynamic range of the proteins constituting it. An alternative to this problem can be considered in the study of low molecular weight serum proteome, which is the fraction of proteins and peptides from which the high molecular weight proteins have been removed [18] [19] [20], this requires other methods of analysis of serum proteins capable of depleting the serum of abundant proteins that would facilitate the detection of serum proteins of low abundance [21].

3.3.1. Revelation of the expression of LMP-1 by ELISA

The estimation of the LMP-1 value is made by comparing the observed optical density for each serum sample or protein extract with that observed for the negative control. Thus, all samples analyzed that have optical densities greater than that observed for the negative control are considered positive for LMP-1.

Analysis of the serum of gastric cancer patients showed that 50% of them were positive for the expression of LMP-1. Statistical analysis using the average compliance test was conducted to confirm the positive results compared to the negative control.

Concerning the LMP-1 rating in the protein extracts of gastric biopsies, the results were similar to those observed in the sera of patients with the disease. In the same manner as above, the average compliance test was used to confirm the results observed.

We also conducted an estimate of the expression of LMP-1 in healthy subjects' sera in order to check whether the LMP-1 expression was specific to gastric cancer patients. The results show that on all samples analyzed, only two of them showed superior to the negative control OD estimated at (0.184 ± 0.009) . Thus, almost all of the healthy

subjects were negative for the expression of LMP-1. Compliance testing an average applied on samples from healthy individuals' sera confirms the results reported above.

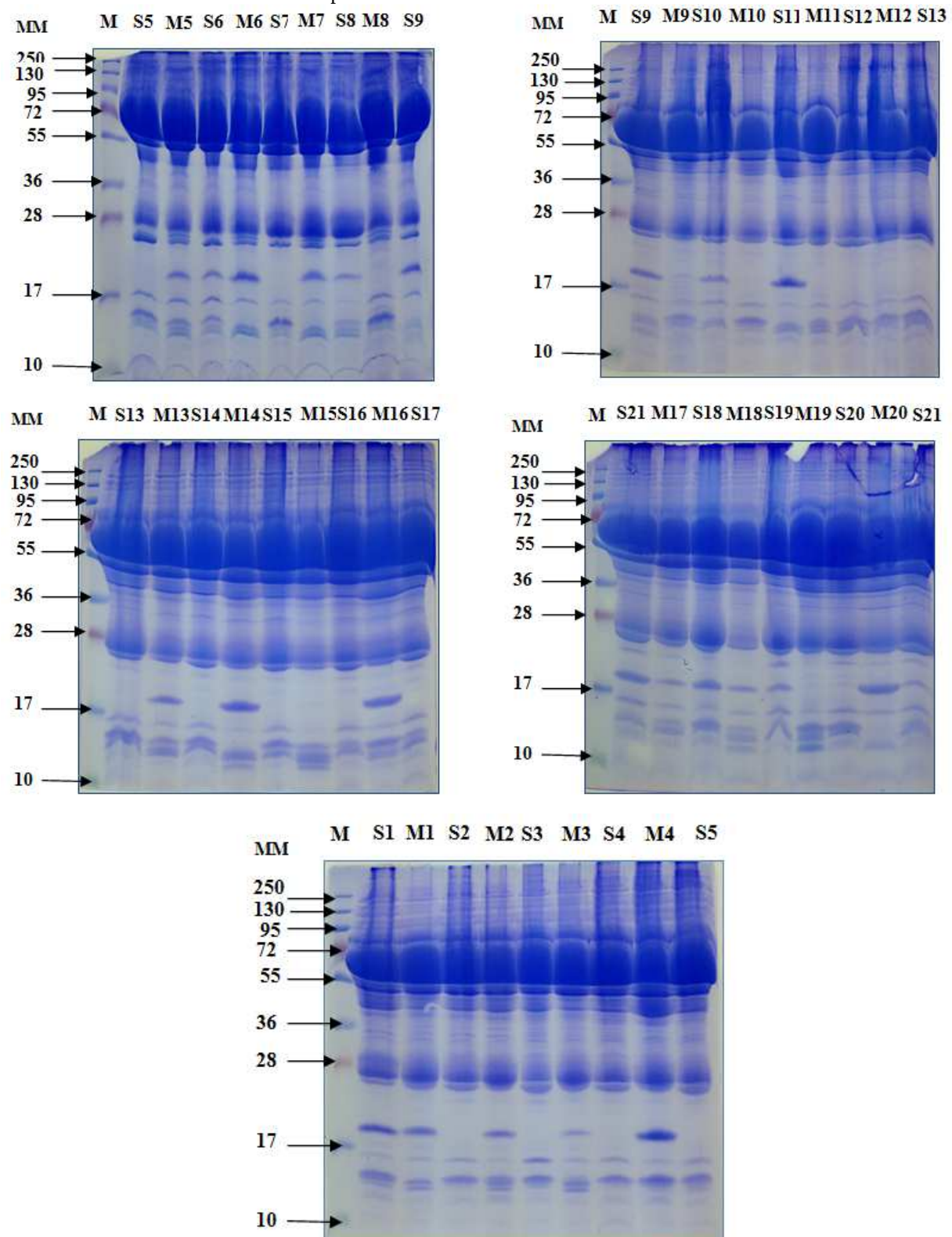


Figure 1: electrophoretic pattern obtained by SDS-PAGE in the presence of β -mercaptoethanol of healthy subjects serum samples: S1-S21 and patients with gastric cancer: M1- M20.

3.3. Quantitative analysis of LMP-1 by ELISA

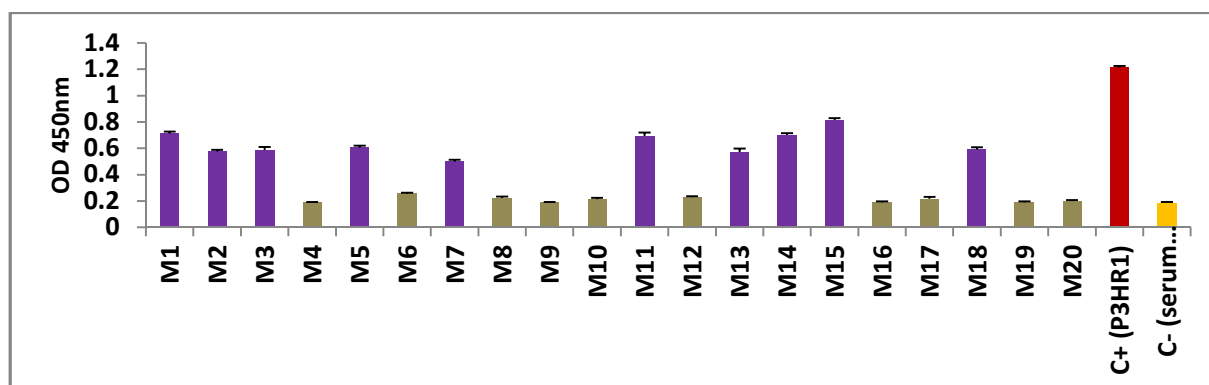


Figure 2a: Detecting the LMP1 with ELISA in serum of gastric cancer patients

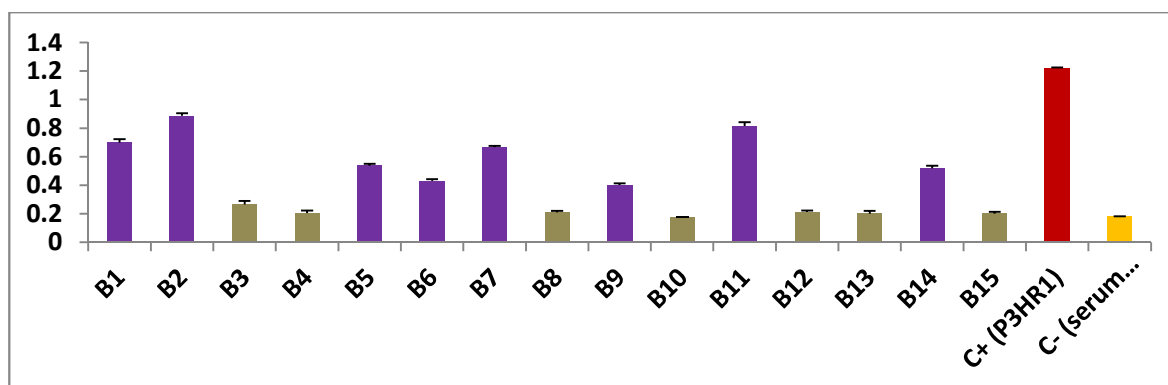


Figure 2b: Detecting the LMP1 with ELISA in biopsies of gastric cancer patients

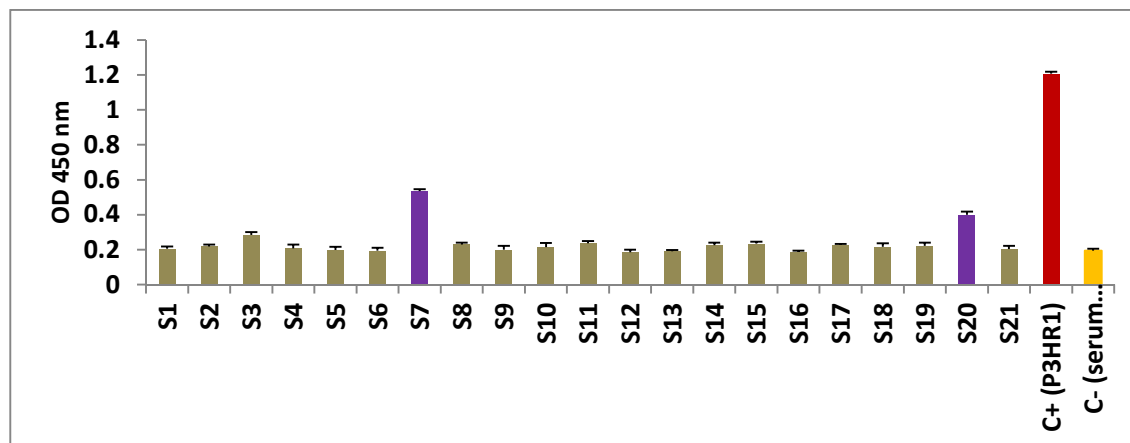


Figure 2c: Detecting the LMP1 with ELISA in the serum of healthy subjects

The revelation of the LMP-1 expression in protein extracts of gastric biopsies and in sera samples of gastric cancer subjects and its absence in the sera of healthy subjects confirms the association of gastric cancer and Epstein Barr virus, and a possible oncogenic role of LMP-1 in the installation cancer.

The association of gastric cancer with the Epstein Barr virus has been reported by several authors. The impact of this association varies according to the authors; it was estimated by [22] [23] [24], 6 to 16% of cases of gastric cancer identified. Our study found the association in nearly 50% of the cases studied. Since EBER1 is very abundant in cells infected by EBV in situ hybridization EBER1 (ISH) is the technique most used for the identification of gastric cancer associated EBV [25].

LMP-1 protein considered major oncogenic EBV with immortalizing and transforming properties [8], has not been so far associated with EBV positive gastric cancer. The work of FUKAYAMA [26] and those of MAEDA [27] show

that the positive EBV gastric cancer has a type I latency expressing EBNA1, EBER, BART and sometimes (40% of cases) LMP2A protein and where expression of LMP-1 and EBNA2 is absent.

However, it is crucial to note that the work of MEIJ [28] showed that the majority of LMP-1 protein are localized in the Golgi apparatus. [29] reported that LMP-1 is associated with exosomes as vesicles and is secreted in this form in the epithelial cells. The LMP-1 protein originates from the level of the cellular machinery (nucleus and cytoplasm) and then it is conducted at the membrane to form transmembrane structure specific to it. It is likely that some of the LMP-1 protein complex to exosomes in order to activate certain signaling pathways such as NF-Kb. Thus, it is preferable to direct research of this protein towards its detection in exosomes. The anti LMP-1 antibody used in this study is the anti LMP1 S12 monoclonal that identifies LMP-1 in membranes as well as complexed with exosomes. Negative cases in the LMP-1 expression probably have gastric cancers negative EBV. It is true that oncologic role of EBV was highlighted on the carcinogenesis of gastric cancer, however, the virus is not the only factor implicated in the installation of this pathology. Studies suggest *Helicobacter pylori* may be an etiological factor in gastric cancer [30], together with dietary and environmental factors. These studies suggest that a diet rich in salt causes atrophic gastritis or dysplasia and promotes gastric carcinogenesis.

3.3.2. Relationship between the age of patient with gastric cancer and the expression of LMP-1 and between the evolution of gastric cancer and the expression of LMP-1

To highlight a possible relationship between the age of patient with gastric cancer and the expression of LMP-1 and between the evolution of gastric cancer and expression of LMP-1, we submitted all values LMP-1 obtained by the ELISA analysis by a non-parametric statistical test equivalent to variance analysis (ANOVA), which is the test of KRUSKAL and WALLIS and where the independent variable is either the age of the patient or the advancement of the disease.

The results of this test show that LMP-1 expression is independent of the age of the patient with gastric cancer. The EBV virus is transmitted through saliva during adolescence, but it is true that in developing countries, primary infection with EBV occurs early, usually in children under three years who are infected by their mothers [31]. This early infection does not seem to influence the oncogenic role of viruses in the gastric cancer installation. This study clearly demonstrated that there is no dependency between the age of the patient with gastric cancer and expression of LMP-1 and thus between patient's age and the association of pathology EBV. The work of Akiba [7] and those of Lee [25] suggested that EBV positive gastric cancer occurs in relatively young patients, but it is essential to note that meta-analyzes have not confirmed this observation.

The results also demonstrated that LMP-1 expression is independent of gastric cancer development, this means that the installation of EBV occurs very early in gastric epithelial cells and it persists during the disease. It obvious that EBV, as it is oncogenic, keeps its genome into the infected cell without killing it while protecting it from the attacks of the immune system [5], this could explain the findings of AKIBA [7] and FUKAYAMA [26] on the relatively good prognosis of EBV-positive gastric cancer compared with EBV-negative gastric cancer.

According to the result of this study, various studies are supportive of an etiologic role of EBV; these studies suggest that the virus infects early gastric epithelial cells allowing better proliferation, suggesting a role of viruses in carcinogenesis [32] [33]. As long as the LMP-1 is expressed early in patients with gastric cancer, this protein could probably serve as a biomarker for early diagnosis of EBV-positive gastric cancer.

CONCLUSION

This work allowed us to compare proteinograms of gastric cancer patients with those of healthy individuals. The only changes that spark interest are some hypo-proteinemia that can be caused by increased protein loss by leakage caused by gastric bleeding or by the loss of weight observed in individuals with gastric cancer. However, because they are not generalized to all patients, it cannot constitute a characteristic of the disease.

Previous investigations which are carried on the serum study showed difficulty identifying the different serum protein and highlight a characteristic proteome of pathology. The comparison of protein profiles of gastric cancer patients with those from healthy individuals allowed us to identify the presence of an additional band of 27 kDa in the former which does not exist in the latter. However, it is difficult to associate this protein band gastric cancer particularly as it is only present in 20% of cases. As for the 18 kDa protein that we find in 65% of patients and in 43% of cases in healthy people.

The detection of the expression of LMP-1 protein in serum and gastric biopsies of patients allows us to associate gastric cancer to EBV, especially since there is no expression of LMP- 1 in the sera of healthy individuals. The

expression of LMP-1 regardless of patient age or the stage of development of gastric cancer may offer an alternative for diagnosis. Thus, LMP-1 appears to be a potential candidate for an early and reliable diagnosis of EBV-positive gastric cancer. Moreover, the LMP-1 detection in the sera of diseased individuals offers a tool that is simple regarding to the technique used, and especially non-binding for the patient often subjected to biopsy samples.

REFERENCES

- [1] A Jemal, F Bray, Mm Center, J Ferlay, E Ward, D Forman D, *Cancer Journal For Clinicians*, **2011**, 61, 69–90.
- [2] J Ferlay, Hr Shin, F Bray, D Forman, C Mathers, Dm Parkin, *Iarc Cancer Base*, **2012**, No. 10.
- [3] C De Martel, D Forman, M Plummer, *Gastroenterology Clinics Of North America*, **2013**, 42 (2), 219–240.
- [4] G Corso, R Seruca, F Roviello, *Annali Italiani Di Chirurgia*, **2012**, 83 (3), 172–176.
- [5] Mp Thompson, R Kurzrock, *Clinical Cancer Research*, **2004**, 10 (1), 803–821.
- [6] H Uozaki, M Fukayama, *International Journal Of Clinical And Experimental Pathology*, **2008**, 1, 198–216.
- [7] S Akiba, C Koriyama, R Herrera-Goepfert, Y Eizuru, *Cancer Science*, **2008**, 99, 195–201.
- [8] N Ahsan, T Kanda, *Journal Of Virology*, **2005**, 79 (7), 4415–4424.
- [9] Cw Dawson, Rj Port, Ls Young, *Seminars In Cancer Biology*, **2012**, 22, 144–153.
- [10] Mw Saif, N Makrilia, A Zalonis, M Merikas, K Syrigos, *European Journal Of Surgical Oncology*, **2010**, 36, 709–717.
- [11] Uk Laemmli, *Nature*, **1970**, 227, 680–684.
- [12] G Surico, P Muggeo, V Muggeo, A Lucarelli, C Novielli, V Conti, N Rigillo, *Annals Of Hematology*, **1999**, 78, 445–448.
- [13] Jt Whicher, *British Journal Of Hospital Medicine*, **1980**, 24, 348–356.
- [14] S Reif, A Jain, J Santiago, T Rossi, *Acta Paediatrica Scandinavica*, **1991**, 80, 482–485.
- [15] Wa Allum, *Surgery*, **2011**, 29 (11), 575–580.
- [16] V Catalano, R Labianca, Gd Beretta, G Gatta, F Braud, E Van Cutsem, *Oncology/Hematology*, **2005**, 54, 209–241.
- [17] C Szafranski, J Bailey, Cw Turck, G Nicol, J Martosella, N Zolotarjova, *Pharmaceutical Genomics*, **2004**, 29, 40–46.
- [18] Jn Adkins, Sm Varnum, Kj Auberry, Rj Moore, Nh Angell, Rd Smith, Dl Springer, Jg Pounds, *Molecular Cellular Proteomics*, **2002**, 1, 947–955.
- [19] Z Streltsova, Sw Lee, M Devlin, Db Deoliveira, J Enright, Rb Kent, Cr Wescott, Tc Ransohoff, Ac Ley, Rc Ladner, *Biotechnology Progress*, **2002**, 18, 182–192.
- [20] S Radhakrishna, Kc Tirumalai, Da Chan, Hj Prieto, Tp Issaq, Dv Timothy, *Molecular & Cellular Proteomics*, **2003**, 2 (10), 1096–1103, 2003.
- [21] Ef Petricoin, Am Ardekani, Ba Hitt, Pj Levine, Va Fusaro, Sm Steinberg, Gb Mills, C Simone, Da Fishman, Ec Kohn, La Liotta, *Lancet*, **2002**, 359, 572–577.
- [22] Ap Burke, Ts Yen, Km Shekitka, L Sobin, *Modern Pathology*, **1990**, 3, 370–380.
- [23] D Shibata, Lm Weiss, *American Journal Of Pathology*, **1992**, 140, 769–774.
- [24] J Van Beek, A Zur Hausen, Ek Kranenbarg, Rj Warring, E Bloemena, Me Craanen, Cj Van De Velde, Jm Middeldrop, Cj Meijer, Aj Van Den Brule, *Modern Pathology*, **2002**, 15, 870–877.
- [25] Jh Lee, Sh Kim, Sh Han, Js An, Es Lee, Ys Kim, *Journal Of Gastroenterology And Hepatology*, **2009**, 24, 354–365.
- [26] M Fukayama, *Pathology International*, **2010**, 60, 337–350.
- [27] E Maeda, M Akahane, H Uozaki, N Kato, N Hayashi, M Fukayama, K Ohtomo, *Abdominal Imaging*, **2009**, 34, 618–625.
- [28] P Meij, Mb Vervoort, Lm Meijer, E Bloemena, Jm Middeldrop, *Journal Of Virology Methods*, **2000**, 90, 193–204.
- [29] K Houali, X Wang, Y Shimizu, D Djennaoui, J Nicholls, S Fiorini, A Bouguermouh, T Ooaka, *Clinical Cancer Research*, **2007**, 13 (17), 4993–5000.
- [30] M Naumaun, Je Crabtree, *Trends Microbiology*, **2004**, 151, 105–114.
- [31] Dt Hochberg, M Souza, Jl Catalina, K Sullivan, M Luzuriaga, Da Thorley-Lawson, *Journal Of Virology*, **2004**, 78 (5), 194–204.
- [32] A Corvalan, S Ding, C Koriyama, *International Journal Of Cancer*, **2006**, 118, 1736–1742.
- [33] Sw Kim, Hc Shin, Iy Kim, *Korean Journal Of Radiology*, **2010**, 11, 697–700.